

**VERSUCHE ZUM ANTIKÖRPERNACHWEIS  
DURCH INDIREKTE KOMPLEMENTBINDUNG  
BEI DER LYMPHOCYTÄREN CHORIOMENINGITIS  
(LCM) DER MAUS**

Hans Albrecht

1975





Digitized by the Internet Archive  
in 2026



AUS DEM INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE,

INFEKTIONS- UND SEUCHENMEDIZIN

FACHBEREICH TIERMEDIZIN

LUDWIG- MAXIMILIANS- UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstand: Professor Dr. Dr. h.c. Anton Mayr

Arbeit ausgeführt unter Anleitung von Herrn Prof.

Dr. Dr. h.c. Erich Traub.

---

VERSUCHE ZUM ANTIKÖRPERNACHWEIS DURCH INDIREKTE

KOMPLEMENTBINDUNG BEI DER LYMPHOCYTÄREN CHORIO-

MENINGITIS (LCM) DER MAUS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

des Fachbereiches Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität

München

von

Hans Albrecht

aus Gauting

München

1975

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereiches Tiermedizin  
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus  
Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. A. Mayr  
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. H.-G. Liebich

Tag der Promotion:

21. Februar 1975



MEINER LIEBEN MUTTER

IN DANKBARKEIT



## INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                                      | Seite |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. EINLEITUNG                                                                                        | 1     |
| 2. SCHRIFTTUM                                                                                        | 2     |
| 2.1. <u>Literatur über die Immunologie und Pathogenese<br/>der murinen LCM</u>                       | 2     |
| 2.2. <u>Bisher gebräuchliche Methoden zum Antikörpernach-<br/>weis bei Mäusen</u>                    | 6     |
| 2.3. <u>Literatur über indirekte Komplementbindung</u>                                               | 8     |
| 3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN                                                                             | 10    |
| 3.1. <u>Material und Methoden</u>                                                                    | 10    |
| 3.1.1. <u>Virus</u>                                                                                  | 10    |
| 3.1.2. <u>Mäuse</u>                                                                                  | 10    |
| 3.1.3. <u>Gewinnung von Mäuse-Immunseren</u>                                                         | 10    |
| 3.1.4. <u>Gewinnung von Meerschweinchen-Immunseren</u>                                               | 11    |
| 3.1.5. <u>Antigen</u>                                                                                | 12    |
| 3.1.6. <u>Komplement</u>                                                                             | 12    |
| 3.1.7. <u>Hämolytisches System</u>                                                                   | 12    |
| 3.1.8. <u>Verdünnungsmittel</u>                                                                      | 12    |
| 3.1.9. <u>Bestimmung der optimalen Antigendosen für die IKB<br/>bzw. die direkte KB Kältebindung</u> | 13    |
| 3.1.10. <u>Ermittlung der Gebrauchsdosis des Mee-IS</u>                                              | 14    |
| 3.1.11. <u>IKB-Teste mit M-IS</u>                                                                    | 14    |
| 3.1.12. <u>Berechnung der Titerwerte bei der IKB</u>                                                 | 15    |
| 3.1.13. <u>Direkte KB (Kältebindung)</u>                                                             | 16    |

|                                                                                                                                                                              | Seite |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 3.2. <u>Versuche und Ergebnisse</u>                                                                                                                                          | 18    |
| 3.2.1. <u>Beispiel eines indirekten Komplementbindungstestes</u>                                                                                                             | 18    |
| 3.2.2. <u>Versuche zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit und -temperatur bei der Antigenneutralisation</u>                                                            | 20    |
| 3.2.3. <u>Vergleich der Wärme- und Kältebindung im Komplementbindungsteil des IKB-Testes</u>                                                                                 | 22    |
| 3.2.4. <u>Bedeutung der Antigenmenge bei der IKB</u>                                                                                                                         | 24    |
| 3.2.5. <u>Antikörpernachweis durch IKB im Vergleich mit der direkten KB (Kältebindung) in Seren von immunen, nicht toleranten Mäusen</u>                                     | 28    |
| 3.2.6. <u>Verhalten von Mäusenormalseren bei der IKB</u>                                                                                                                     | 33    |
| 3.2.7. <u>Reaktionsweise von Serumgemischen und Einzelseren von persistent (kongenital) infizierten NMRI-Mäusen verschiedenen Alters in der IKB und der DKB in der Kälte</u> | 34    |
| 3.2.8. <u>Altersmäßige Verteilung der IKB-positiven, immun-toleranten NMRI-Mäuse</u>                                                                                         | 35    |
| 3.2.9. <u>Prüfung von Serumgemischen und Einzelseren von persistent (kongenital) infizierten CBA/J-Mäusen verschiedener Altersstufen im IKB-Test</u>                         | 36    |
| 4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE                                                                                                                                                | 40    |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG                                                                                                                                                           | 44    |
| 6. LITERATURVERZEICHNIS                                                                                                                                                      | 48    |

Lebenslauf

Verzeichnis der im Text und in den Tabellen vor-  
kommenden Abkürzungen.

|        |   |                                   |
|--------|---|-----------------------------------|
| LCM    | = | lyphocytaire Choriomeningitis     |
| KB     | = | Komplementbindung                 |
| KBR    | = | Komplementbindungsreaktion        |
| IKBT   | = | indirekter Komplementbindungstest |
| DKB    | = | direkte Komplementbindung         |
| IKB    | = | indirekte Komplementbindung       |
| V-Ag   | = | Virusantigen                      |
| N-Ag   | = | Normalantigen                     |
| M-S    | = | Mäuseserum                        |
| M-IS   | = | Mäuseimmunserum                   |
| M-NS   | = | Mäusenormalserum                  |
| Mee-S  | = | Meerschweinchenserum              |
| Mee-IS | = | Meerschweinchenimmunserum         |
| Mee-NS | = | Meerschweinchennormalserum        |
| HS     | = | hämolytisches System              |
| C'     | = | Komplement                        |
| P-NaCl | = | Puffer (siehe Verdünnungsmittel)  |
| ip     | = | intraperitoneal                   |
| ic     | = | intracerebral                     |
| sc     | = | subcutan                          |
| u      | = | unverdünnt                        |
| ipl    | = | subcutan in die Planta            |



## 1. EINLEITUNG

Als Methoden zum Antikörperrnachweis bei der LCM der Mäuse sind bisher der Neutralisationstest, die direkte Komplementbindung und, vor allem in jüngerer Zeit die Immunfluoreszenzmethode benutzt worden. Als weiteres Verfahren sollte in der vorliegenden Arbeit die indirekte Komplementbindung angewandt werden, mit der man neben komplementbindenden auch antigenneutralisierende Antikörper nachweisen kann. Ihre Ergebnisse wurden bei einer größeren Zahl von Mäuseren, deren Spendertiere auf verschiedene Art immunisiert worden waren, mit den Resultaten der direkten Komplementbindung (Kaltebindung) verglichen.

## 2. SCHRIFTTUM

### 2.1. Literatur über die Immunologie und Pathogenese der murinen LCM.

Zum besseren Verständnis der Problematik werden zunächst einige Angaben über das Virus-Wirtsverhältnis bei dieser Seuche gemacht, die als Forschungsmodell für menschliche Autoimmunkrankheiten "immune complex diseases" eine erhebliche Bedeutung erlangt hat.

Es handelt sich hierbei um eine meist latent verlaufende Virusinfektion, deren Erreger der Prototyp der neu aufgestellten Gruppe der RNS-haltigen Arenoviren ist. Diese kommen in der Natur vorzugsweise bei kleinen Nagetieren (Hausmäusen, Feldmäusen, Hamstern), aber auch mehr oder weniger häufig beim Menschen vor. Als natürliche Wirte der verschiedenen Abarten sind Nagetiere entweder bereits nachgewiesen worden oder aber werden solche vermutet. Bei der LCM ist das natürliche Virusreservoir die graue Hausmaus, während der für natürliche Infektion ebenfalls empfängliche Hamster die Voraussetzungen hierfür nicht voll erfüllt.

Wie Laborversuche an weißen Mäusen gezeigt haben, erfolgt die Übertragung des LCM-Virus bei der Maus hauptsächlich vertikal (25). Neben der vorherrschenden transovarialen Virusübertragung (29, 14) spielt unter bestimmten Umständen auch die diaplazentare (29) eine gewisse Rolle. Auch die vertikale Übertragung durch die Muttermilch kann in der Natur vorkommen (29). Vertikal infizierte Mäuse werden regelmäßig zu Virusträgern. Sie zeigen monatelang keine Krankheits-

erscheinungen, benerbergen das Virus lebenslang in hoher Konzentration im Blut und in den Organen und scheiden laufend beträchtliche Virusmengen aus (27) . Spezifische Antikörper werden von persistent infizierten Tieren entweder gar nicht oder nur in Spuren gebildet (28); trotzdem sind sie voll immun gegen experimentelle Superinfektion. Ihre Immunität wurde als Schulbeispiel einer Autointerferenzimmunität bezeichnet (32) . Die bei solchen Mäusen bestehenden immunologischen Verhältnisse wurden von Burnet und Fenner (2) als immunologische Toleranz angesprochen, eine Auffassung, der heute noch die Mehrzahl der LCM-Forscher zustimmt (11) .

Bei persistent infizierten, immuntoleranten Mäusen zeigt das LCM-Virus eine starke Affinität zum lymphoretikulären System, zum Geschlechtsapparat sowie zu gewissen Drüsen (Milchdrüse, Speicheldrüsen, Leber, Pankreas) .

Die horizontale Infektion durch infektiöse Sekrete und Exkrete (Nasensekret, Urin, Sperma, Vaginalschleim, Milch, Speichel durch Biss) ist möglich bei Mäusen, bei denen eine vertikale Infektion nicht stattgefunden hat. Erfolgt diese bald nach der Geburt, so kommt es ebenfalls zu Immuntoleranz.

Nach der ersten Lebenswoche durch Kontakt oder experimentell infizierte Mäuse können charakteristische Symptome zeigen, die vom Infektionsmodus, vom Alter zur Zeit der Infektion sowie von der Virulenz und dem Tropismus des Infektionsvirus bestimmt werden (27) . Besonders charakteristische Symptome (Streckkrämpfe) treten nach der Infektion auf. Solche Tiere sind

nicht immuntolerant. Sie bilden nach der Durchseuchung spezifische Antikörper, die mit Hilfe des Neutralisationstestes, der KBR oder der Immunfluoreszenztechnik nachgewiesen werden können. Bei der KBR ist ein lösliches virusspezifisches Antigen von Bedeutung, das zuerst von Smadel und Wall (23) nachgewiesen worden ist. Die Krankheitserscheinungen bei akut infizierten, nicht toleranten Mäusen beruhen nach heutiger allgemeiner Auffassung (7) auf einer zellulären Abwehrreaktion des Organismus, da nicht modifiziertes LCM-Virus praktisch apathogen für Mäuse ist und die Symptome durch Röntgenbestrahlung (21) sowie durch Behandlung mit immunsuppressiven Mitteln (6) oder durch neonatale Thymektomie (22) vermindert werden können. Die akute Erkrankung bei nicht toleranten Mäusen stellt also eine Autoimmunkrankheit dar.

Im Gegensatz zu kongenital oder neonatal infizierten Mäusen sind die Virus- und Antigentiter der Organe bei akut kranken, nicht toleranten Tieren relativ niedrig (32) und die Viruspersistenz bei Rekonvaleszenten ist von beschränkter Dauer. Sie kann sich verlängern bei Mäusen, die besonders schwer erkrankt waren (27) oder bei Tieren, denen sehr große Virusmengen injiziert wurden (7). Im letzteren Fall können Krankheitserscheinungen fehlen oder relativ mild sein. Man spricht hier von Immunparalyse, die der durch große Dosen Pneumokokkenpolysaccharid bei Mäusen erzeugbaren Immunparalyse wesensverwandt ist. Sie hält im allgemeinen weniger lang an als die durch kongenitale (transovarielle bzw. diaplazentare) oder neonatale Infektion erzeugte Immuntoleranz.

Besondere Aufmerksamkeit verdienen die zuerst von Hotchin und Mitarbeitern (8) beobachteten Späterkrankungen bei neonatal infizierten,

immuntoleranten Mäusen, die häufig mit Glomerulonephritis einhergehen. Da in den Nieren solcher Tiere große Mengen Gammaglobulin und auch spezifisches Antigen nachgewiesen werden können, nimmt man an, daß es sich hierbei um Antigen- Antikörperkomplexe handelt, die in den Nieren abgelagert werden und die Schädigung der Glomeruli verursachen. Hier scheint also eine Antigen- Antikörperreaktion im Spiele zu sein im Gegensatz zu der Autoimmunreaktion bei akut kranken, nicht toleranten Mäusen, deren Krankheitserscheinungen auf einer lymphozytären Abwehrreaktion des Körpers beruhen. Im letzteren Falle scheinen Antikörper von sehr untergeordneter Bedeutung zu sein (7) .

Die wesentlichen serologischen Befunde bei der LCM der Mäuse sind bisher mit Hilfe des Neutralisationstestes, der KBR und, in jüngerer Zeit, vor allem auch mittels der Immunfluoreszenzmethode erhoben worden. Als weitere Methode sollte in der vorliegenden Arbeit die indirekte Komplementbindung geprüft werden, mit der man neben komplementbindenden auch antigenneutralisierende Antikörper nachweisen kann. Für die Untersuchungen wurden Immunsere von experimentell infizierten und danach hyperimmunisierten erwachsenen Mäusen, Sere von Muttermäusen, die von ihren neonatal infizierten Jungen angesteckt worden waren, sowie Sere von persistent infizierten, immuntoleranten Mäusen verschiedener Altersstufen benutzt. In vielen Fällen konnten die Ergebnisse mit denen der direkten KBR (Kaltebindung) verglichen werden, um die relative Empfindlichkeit dieser beiden Methoden zu testen.

## 2.2. Bisher gebräuchliche Methoden zum Antikörpernachweis bei Mäusen.

Bei der künstlich infizierten erwachsenen Maus wird eine aktive Immunität gegenüber einer Zweitinfektion sehr rasch ausgebildet. Die intraperitoneale Immunitätsprüfung einen Tag nach intraperitonealer Virusinjektion führte zu typischen Streckkrämpfen. Wurde jedoch diese Immunitätsprüfung erst nach 5 Tagen durchgeführt, so waren bereits einige, nach 8 Tagen alle Mäuse geschützt (26) .

Die Ergebnisse von Serumneutralisationstesten bei solchen Tieren waren lange Zeit hindurch negativ oder zweifelhaft. Erst nach Verbesserung der Testmethoden (21, 31, 20, 9) gelang der Nachweis von neutralisierenden Antikörpern in Seren von LCM- immunen, nicht toleranten Mäusen nahezu regelmäßig. Einen weiteren Fortschritt brachte die Verwendung von Gewebekulturen als Testmedien für Serum- Virusgemische. Da das LCM- Virus in so gut wie allen empfänglichen Zellarten keinen sicher reproduzierbaren zytopathogenen Effekt hat, ist dem Plaque- Reduktionstest bisher kein durchschlagender Erfolg beschieden gewesen. Als Alternativmethode verdient das Verfahren von Lehmann- Grube und Hesse (12) Beachtung, die Röhrchenkulturen von L- Zellen als Testmedien für Neutralisationsgemische verwenden und die Infektion der Zellen nach Bildung von Kb- Antigen beurteilen. Die von diesen Autoren ermittelten Neutralisationstiterwerte von Seren LCM- immuner, nicht toleranter Mäuse waren relativ niedrig, verglichen mit den Titern bei anderen Viruskrankheiten; außerdem erfolgte die Bildung solcher Antikörper sehr langsam. Dies wird auch von Hotchin et al. (9) bestätigt, die messbare

Antikörpertiter manchmal erst viele Monate nach der Infektion feststellen konnten.

Komplementbindende Antikörper sind in Seren von LCM- immunen, nicht toleranten Mäusen mühselos nachzuweisen (28, 25) . Im Gegensatz zu den neutralisierenden Antikörpern entstehen sie verhältnismäßig rasch und erreichen bereits etwa in der 4. Woche pi ihren höchsten Titer (13, 24). Sie sind leichter nachzuweisen bei Kältebindung als bei Wärmebindung und verbleiben bei der Maus lange Zeit, vermutlich das ganze Leben lang, im Blut (13) .

Dagegen schlug der Nachweis von komplementbindenden Antikörpern im Blut von persistent infizierten, immuntoleranten Mäusen zunächst im wesentlichen fehl (28, 30) . Gelegentlich waren Spuren von Antikörpern durch die KBR festzustellen (30) .

Wichtige neue Erkenntnisse lieferte die Immunfluoreszenzmethode. So konnten Oldstone und Dixon (15) im Jahre 1967 mit Hilfe dieser Methode große Mengen von murinem Gammaglobulin in den Nieren von neonatal infizierten, drei Monate alten Mäusen nachweisen, deren Seren frei von KB- Antikörpern waren. Durch ein besonderes Elutionsverfahren gelang es diesen Autoren, geringe Mengen von KB- Antikörpern aus Homogenaten von nephritischen Nieren solcher Mäuse zu eluieren. Allerdings konnten Hotchin und Baker (zitiert nach 7, Seite 38) , die sich derselben Technik bedienten, diesen Befund nicht bestätigen. Pollard et al. (16) konnten ebenfalls große Mengen von IgM in den Nieren von gnotobiotischen, persistent mit LCM- Virus infizierten Mäusen mit Glomerulonephritis

feststellen. Es ist jedoch noch nicht über jeden Zweifel hinaus erwiesen, daß es sich bei dem festgestellten Gammaglobulin um LCM-spezifisches Antikörperglobulin handelt. Nachgewiesen wurde lediglich, daß Nierenextrakte von solchen Mäusen Komplement binden. Auf Grund dieser Befunde wurde die Theorie aufgestellt, daß sich in den Nieren immuntoleranter Mäuse Virus- Antikörperkomplexe ablagern, die für die Nierenschädigungen verantwortlich sind. Diese Theorie hat bereits Eingang in Lehrbücher gefunden.

### 2.3. Literatur über indirekte Komplementbindung.

Vor über 60 Jahren wurden von Bakteriologen die ersten Beobachtungen über ein Phänomen gemacht, das der indirekten Komplementbindung vergleichbar ist. So berichten Calmette und Massol (3) erstmals im Jahre 1910 über eine Hemmung der Komplementbindung bei Tuberkulose zwischen Immunsereen von Pferden und Kälbern, die jeweils mit Tuberkulosebakterien immunisiert worden waren. Im Jahre 1923 stellten Zinsser und Parker (37) fest, daß Antipneumokokkenserum, das in Gegenwart von Pneumokokkenpolysaccharida kein Komplement band, unter gewissen Umständen jedoch die Komplementbindung zwischen Kaninchenantipneumokokkenserum und typspezifischem Polysaccharid verhindern konnte. Goodner und Horsfall (5) verfolgten 1936 dieses Phänomen weiter, wobei sie besonders das richtige Mischungsverhältnis der beiden benutzten Immunsereen betonten. In den Jahren 1947 und 1948 entwickelte Rice auf Grund der eben genannten Befunde eine praktikable und empfindliche in vitro-

Methode zum Nachweis von Antikörpern in nicht komplementbindenden Seren (17) . Sie wandte zunächst das Verfahren bei Geflügelkrankheiten an, da Geflügelseren normalerweise in Gegenwart von spezifischem Antigen Komplement nicht binden. Günstige Ergebnisse wurden zunächst bei der Salmonellose des Geflügels (18) erzielt. Andere Forscher machten Gebrauch von diesem Verfahren bei der Newcastle- Krankheit der Hühner (36) , bei der Ornithose der Hühner und Enten (10) sowie bei Pockenviren (4) . Im Jahre 1953 berichteten Rice und Brooksby (19) über Versuche mit der indirekten Komplementbindung bei der Maul- und Klauenseuche der Rinder, doch machten sie in den späteren Jahren keinen praktischen Gebrauch von der Methode. Traub und Mitarbeiter (33, 34) benutzten die Methode im Iran in etwas abgeänderter Form zum Antikörpernachweis bei Kindern nach Schutzimpfung gegen Maul- und Klauenseuche. Die Ergebnisse stimmten im allgemeinen mit denen der linguale Testinfektion bei Versuchsrindern und den Resultaten von Neutralisationstesten mit den Seren dieser Rinder gut überein. Bei späteren Untersuchungen in der Türkei, wo mit Hilfe der indirekten KBR bei Rindern, Schafen und Ziegen die Vaccinierung gegen die Maul- und Klauenseuche kontrolliert wurde, lieferten Rinder- und Ziegenseren bei Anwendung dieser Methode klare Ergebnisse (Traub, mündliche Mitteilung) . Dagegen bereiteten Schafseren insofern Schwierigkeiten, als sie im Gegensatz zu Rinder- und Ziegenseren sowohl in direkten als auch in indirekten KB- Testen positiv reagierten. Die IKB war auch anwendbar bei Mäusen, die mit Maul- und Klauenseuchevaccine in fallenden Dosen vorbehandelt worden waren (35) , und die bei Muttermäusen gemessenen Titerwerte stimmten im allgemeinen gut überein mit den Ergebnissen der Testinfektion bei ihren Sauglingsmäusen (1) .

### 3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

#### 3.1. Material und Methoden

##### 3.1.1. Virus

Zur Immunisierung von Mäusen und Meerschweinchen wurden die Virusstämme WCC (376. bzw. 377. ic Mäusepassage) und W (5. bis 7. ip Mäusepassage) verwendet (15) .

Beim Stamm WCC handelt es sich um ein an das Mäusegehirn adaptiertes, modifiziertes Passagevirus, während der Stamm W im Laufe der wenigen Mäusepassagen seine ursprünglichen Eigenschaften beibehalten haben dürfte. Beide Stämme sind serologisch identisch.

##### 3.1.2. Mäuse

M-1S bzw. M-1S wurden von nicht ingezuchteten, weissen Mäusen des NMRI- Stammes, teils von grauen Tieren des ingezuchteten CBA/J- Stammes gewonnen. Lieferant der Mäuse war in beiden Fällen die Firma Ivanovas, Kisslegg im Allgäu.

##### 3.1.3. Gewinnung von Mäuse-Immunseren

Zur ipl oder ip Erstinfektion erwachsener Tiere diente jeweils der Stamm WCC, da er sowohl für Mäuse als auch für Meerschweinchen sehr wenig pathogen ist. Verluste traten nach solchen Infektionen nicht auf. Mindestens vier Wochen nach der Erstinfektion wurden die Tiere durch ic Injektion von 10% igem, infektiösem Mäusegehirnextrakt (WCC oder W) auf Immunität geprüft. Die blutentnahme durch Herzpunktion in tiefer

Äthernarkose erfolgte 10 bis 14 Tage nach dieser ersten Hyperimmunisierung. In Ausnahmefällen (siehe Tab. 2 und 5) wurden NMRI- bzw. CBA/J- Mäuse nach der Erstinfektion zwei- bzw. fünf mal in etwa einwöchigem Zeitabstand hyperimmunisiert und 14 Tage nach der letzten Injektion entblutet. Hierbei wurden jeweils 0,5 ml eines infektiösen 10%- igen Gehirnextraktes (WCC) ip injiziert.

Grundsätzlich wurden alle Tiere, die der Herstellung von Immunseren dienten, mit homologem Material behandelt, um die Entstehung von unspezifischen Antikörpern zu vermeiden.

Die in den Tabellen 4 bis 10 erwähnten Seren von kontaktinfizierten, nicht toleranten Muttermäusen bzw. von persistent infizierten, immun-toleranten Mäusen verschiedener Altersstufen stammten aus Versuchen von Prof. E. Traub. Weitere Angaben über die getesteten Mäuseseren finden sich in den Tabellen.

#### 3.1.4. Gewinnung von Meerschweinchen- Immunseren

Die Spendertiere wurden vier Wochen nach ipl Erstinfektion ebenfalls ipl hyperimmunisiert (0,5 ml eines 10%- igen Extraktes aus infektiösen Milzen, Lungen, Lebern von Meerschweinchen sc in jeae Planta) . Zur Steigerung der immunisierenden Wirkung wurde diesem Extrakt Saponin (0,75 mg/ml) zugesetzt. Die Tiere wurden 10 bis 14 Tage nach der Hyperimmunisierung entblutet und lieferten hochwertige, nicht anti-komplementäre Sera.

Mausesera wurden 30 Min. bei  $58^{\circ}\text{C}$ , Meerschweinchensera ebenfalls 30 Min. , jedoch bei  $56^{\circ}\text{C}$  inaktiviert.

### 3.1.5. Antigen

Als Antigene dienten 10%- ige Milzextrakte persistent infizierter bzw. normaler NMRI- Mäuse, die im Alter von 3 bis 4 Wochen getötet wurden. Solche Extrakte, die als Ag- Verdünnungen 1:10 angesehen wurden, waren nicht antikomplementär und bewarnten bei Tiefrieren bei  $-22^{\circ}\text{C}$  ihre volle Wirksamkeit monatelang.

Zur Extraktion wurde VM 3 ohne Lactalbuminhydrolysat benutzt (5,0 g NaCl; 4,3 g KCl; 0,24 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 2,0 g  $\text{NaHCO}_3$ ; 1,8 g Glucose; 0,01 g wasserlösliches Phenolrot; dest. Wasser ad 1000 ml) .

### 3.1.6. Komplement

In allen Versuchen wurde konserviertes Meerschweinchenkomplement der Behringwerke AG, Marburg, Lahn verwendet.

### 3.1.7. Hämolytisches System

Dieses war eine 2%- ige Suspension vier mal gewaschener, sensibilisierter Hammelblutkörperchen (Ambozeptor der Behringwerke AG, Marburg, Lahn) in 0,9%- iger NaCl- Lösung.

### 3.1.8. Verdünnungsmittel

Als Verdünnungsmittel für die übrigen Reagenzien diente phosphatgepufferte  $\frac{\text{m}}{\text{m}}$  Kochsalzlösung mit Ca- Ionen und Mg- Ionen (0,3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;

2,58 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 6,45 g NaCl; 0,17 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,033 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; dest. Wasser ad 1000 ml) .

### 3.1.9. Bestimmung der optimalen Antigendosen für die IKB bzw. die direkte KB Kältebindung

Zu diesem Zweck wurden "Schachbrettversuche" ausgeführt, in denen steigende Ag- Verdünnungen (je 0,1 ml) gegen steigende Verdünnungen von Mee-IS (je 0,1 ml) in Gegenwart einer zuvor durch Titration ermittelten C'- Dosis (1,2 Einheiten) getestet wurden. Als Behälter für die Reaktionsgemische dienten Kahn- Röhrchen. Die Gemische wurden jeweils doppelt angesetzt. Die eine Hälfte wurde 30 Min. im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  bebrütet zwecks Ermittlung der für die IKB geeigneten Ag- Verdünnungen. Die andere Hälfte wurde 21 h im Kühlschrank bei  $+3^\circ\text{C}$  gehalten, um die für die direkte Kältebindung optimale Ag- Dosis festlegen zu können. Bei jedem Test wurden Kontrollröhrchen eingeschaltet, in denen die verschiedenen Reagenzien systematisch durch P-NaCl ersetzt wurden. Am Ende der Bindungsperiode wurden jedem Röhrchen 0,2 ml HS zugesetzt. Die erste Ablesung erfolgte, nachdem die Gemische 30 Min. im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  bebrütet worden waren. Die zweite Ablesung wurde am nächsten Morgen vorgenommen, dh. nach spontaner Sedimentierung der Zellen im Kühlschrank. Da die Ag- Dosis im IKB- Test nur 0,05 ml beträgt, wurde als Ag- Gebrauchsdosis jeweils die zweit höchste Ag- Verdünnung ausgewählt, die in Gegenwart sämtlicher, noch voll wirksamer Mee-IS- Verdünnungen die Hämolyse 100%- ig hemmte.

### 3.1.10. Ermittlung der Gebrauchsdosis des Mee-IS

Letzere wurde gleichzeitig mit der Ag- Gebrauchsdosis in den oben genannten "Schachbrettversuchen" bestimmt. Es handelte sich um die höchste Serumverdünnung, die in Gegenwart sämtlicher noch voll wirksamer Ag- Verdünnungen die Hämolyse vollständig hemmte. Bei derartigen Testen waren fast immer Prozoneen erkennbar. Es kam darauf an, Ag- bzw. Serumverdünnungen auszuwählen, die sowohl starkes als auch schwaches Serum bzw. Ag sicher erfassen konnten.

### 3.1.11. IKB- Teste mit M-IS

Diese Teste wurden im wesentlichen nach dem von Traub und Mitarbeitern (33) bei Maul- und Klauenseuche angegebenen Verfahren ausgeführt. Jeder Test besteht aus einem Neutralisations- und einem Komplementbindungsteil (Wärmebindung). Falls ausreichende Serummengen verfügbar sind, werden Sera, die unverdünnt eine positive Reaktion ergaben, anschließend titriert. In manchen Versuchen wurde auch die in den Neutralisationsgemischen nicht neutralisierte Ag- Menge titrimetrisch bestimmt. Dieser Test war jedoch in den meisten Fällen wegen ungenügender M-IS- Mengen nicht durchführbar.

Bei der Neutralisation wurden Gemische von unverdünntem M-IS bzw. M-NS und V-Ag bzw. N-Ag (wegen der Verdünnung durch das M-S in zweifach stärkerer Konzentration als die zuvor im "Schachbrettversuch" ermittelte optimale Ag- Verdünnung) 60 Min. im Wasserbad bei 37°C bebrütet.

Vor der Durchführung des KB- Testes (Wärmebindung bei 37°C, 30 Min.) mit den Neutralisationsgemischen als Ag und Mee-IS bzw. Mee-NS wurde

das C' in Gegenwart von Gemischen von gleichen Teilen M-IS plus N-Ag bzw. M-NS plus V-Ag titriert, wobei jeweils nur die höchste, im Hauptversuch benutzte Konzentration dieser Reagenzien verwendet wurde. Die Titrationsröhrchen wurden 30 Min. im Wasserbad bei 37°C gehalten. Die Gebrauchsverdünnung des C' (etwa 1,2 Einheiten bezogen auf 100%-ige Hämolyse) wurde auf Grund dieser Titrationsergebnisse festgelegt. Da Mäusesera unterschiedlich antikomplementär sind, mußten für verschiedene, gleichzeitig getestete Sera oft verschiedene C'-Dosen verwendet werden. Die Versuchsanordnung im einzelnen ist aus Tabelle 1 ersichtlich, in der auch sämtliche Kontrollen aufgeführt sind.

Da die meisten Immunseren von nicht toleranten Mäusen auch direkt C' binden, war es nötig, das Ausmaß der direkten KB mit einer besonderen Röhrenreihe zu kontrollieren, bei der Mee-IS durch Mee-NS ersetzt wurde (Röhrchen Nr. 3 und 23-28 in Tabelle 1). Da einige Mäusesera etwas hämolytisch waren und auch die Milzantigene eine rote Eigenfärbung aufwiesen, wurde zur Erleichterung der Ablesung eine weitere Reihe von Röhren als Farbkontrollen (siehe Nr. 2 und 17-22 sowie 7 und 35-40 in Tabelle 1) eingeschaltet, die nur Mäuseserum und Antigen plus HS enthielten und im übrigen genauso behandelt wurden wie die entsprechenden Reaktionsgemische. Zur Sicherung der Spezifität der Reaktionen dienten weitere Kontrollen (Nr. 4, 5, 9, 10).

### 3.1.12. Berechnung der Titerwerte bei der IKB

Soweit die Stärke der Reaktionen dies zuließ, wurden folgende Titerwerte ermittelt:

a) Der Neutralisationsendpunkt, erkennbar am Röhren mit der höchsten

Serumverdünnung, das nach der Sedimentation der Erythrozyten im Vergleich mit der entsprechenden Farbkontrolle wahrnehmbare Hämolyse zeigte. Spezialversuche, in denen Hammelblutkörperchen derselben Konzentration wie im HS durch Serienverdünnung in dest. Wasser mit nachfolgendem Tieffrieren hämolysiert wurden, ergaben, daß 3%-ige Hämolyse visuell eben noch feststellbar ist, auch wenn eine gewisse Trübung durch andere Reagenzien, zB. lipoidhaltiges Serum, vorhanden ist. Beim M-IS in Tabelle 1 lag der Endpunkt bei der Verdünnung 1:40 (siehe Röhrchen Nr. 15) .

b) Der 50%- Titer der direkten KB durch das M-IS wurde auf der Basis der Hämolysegrade bei der Serumtitration (Tabelle 1, Röhrchen Nr. 3 und 23-28) graphisch ermittelt (35) . Im vorliegenden Fall war es die M-IS- Verdünnung 1:1,7 .

c) Der 50%- Titer für die Neutralisation durch das M-IS ergab sich aus der Differenz der Hämolysegrade bei der indirekten und der direkten KB (siehe Diskussion) . Der 50%- Neutralisationstiter wurde ebenfalls graphisch bestimmt (M-IS- Verdünnung 1:3,3 in Tabelle 1) .

### 3.1.13. Direkte KB (Kältebindung)

Den Testen ging jeweils eine C'- Titration in Gegenwart der niedrigsten, im Hauptversuch geprüften Serum- bzw. Antigenverdünnung (separat) voraus. Hierbei wurden die Gemische von M-S bzw. Ag und abgestuften C'- Verdünnungen vor Zusatz von HS und anschließender Bebrütung im Wasserdad (30 Min. bei 37°C) für 21 h im Kühlschrank bei +5°C gehalten. Wiederum wurden etwa 1,2 C'- Einheiten als Gebrauchsdosis ausgewählt. Bei Kältetitation traten die antikomplementären Eigenschaften mancher Mäusesera stärker in Erscheinung als bei Titration in der Wärme.

Die Ag- Gebrauchsdosis wurde im "Schachbrettversuch" ermittelt (siehe oben) , wobei die Bindung in der Kälte ( $+3^{\circ}\text{C}$ ; 21 h) erfolgte.

Im Hauptversuch wurden steigende M-IS- Verdünnungen (je 0,1 ml) gegen die konstante Gebrauchsdosis des V-Ag und ebenso hoch verdünntes N-Ag (je 0,1 ml) getestet. Nach Kaltebindung ( $+3^{\circ}\text{C}$ ; 21 h) und Zusatz von HS wurden die Röhrchen 30 Min. im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  bebrütet. Die endgültige Ablesung erfolgte nach Sedimentierung der Erythrozyten. Der 50%-KB- Titer wurde wiederum graphisch bestimmt. Bei der Beurteilung der relativen Empfindlichkeit der IKB und der direkten Kaltebindung (siehe Tabellen 4-6) wurden von dem Titerwert der letzteren jeweils  $0,3 \log_{10}$  subtrahiert, da bei der IKB die M-IS- Komponente nur 0,05 ml beträgt.

#### 3.1.14. Abgekürzte Teste

Bei der Prüfung von Einzelseren, insbesondere solchen von den relativ kleinen CBA/J- Mäusen, reichte die gewonnene Serummenge häufig nicht aus für einen vollständigen Test mit allen in Tabelle 1 verzeichneten Kontrollen; daher mussten in solchen Fällen die Zahl der Röhrchen bei der C'- Auswertung reduziert und die nicht unbedingt nötigen Kontrollen im Hauptversuch ausgelassen werden.

### 3.2. Versuche und Ergebnisse

#### 3.2.1. Beispiel eines indirekten Komplementbindungstestes

In Tabelle 1 ist ein solcher Test verzeichnet, der die Reaktionsweise eines M-IS von immunen, nicht toleranten CBA/J- Mäusen aufzeigt.

Dieses M-IS neutralisierte noch in der Verdünnung 1:40 einen kleinen Teil des V-Ag, erkennbar an einer Spur von Hämolyse in Röhrchen Nr. 15, während das M-NS unverdünnt (Röhrchen Nr. 6) und in der gesamten Verdünnungsspanne von 1:2,5 bis 1:80 (Röhrchen Nr. 29-34) Nullwerte ergab. Die direkte KB durch das M-IS endete bei Serumverdünnung 1:5 (Röhrchen Nr. 24) ; dagegen reagierte das M-NS unter den gleichen Versuchsbedingungen negativ (100%- ige Hämolyse in den Röhrchen Nr. 8 und 41-46) .

Die nach dem im Abschnitt "Material und Methoden" angegebenen Verfahren errechneten Titerwerte des M-IS sind am Fuße der Tabelle 1 vermerkt. Die Ag- Neutralisation war im vorliegenden Fall etwa doppelt so stark wie die direkte KB bei 37°C.

Tabelle 1 Beispiel eines indirekten Komplementbindungstestes mit Mauseiweiss- bzw. Normalserum

| IKB-Test mit unverdünnten Seren |                                         |             |      |      |        |        |      |        |                  | Titration des MIS (MNS als Kontrolle) |                                             |           |      |        |        |     |        |     |                                                     |
|---------------------------------|-----------------------------------------|-------------|------|------|--------|--------|------|--------|------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------|-----------|------|--------|--------|-----|--------|-----|-----------------------------------------------------|
| Röhrchen Nr.                    | Neutral.-Gemische<br>(60 Min. bei 37°C) |             |      |      |        |        |      |        | Hämolysegrad (%) | Röhrchen Nr.                          | Neutral.-<br>Gemische (60<br>Min. bei 37°C) |           |      |        |        |     |        |     | Hämolysegrade (%)<br>bei MS-Verdünnung<br>(1:.....) |
|                                 | MIS unverd. *                           | MNS unverd. | V-Ag | N-Ag | Mee-IS | Mee-NS | O'   | P-NaCl |                  |                                       | MIS-Verd.                                   | MNS-Verd. | V-Ag | Mee-IS | Mee-NS | O'  | P-NaCl | HS  |                                                     |
| 1 0,05                          |                                         |             | 1:80 | 1:80 | 1:40   | 1:40   | 1:20 |        | 50               | 11-16                                 | 0,05                                        |           | 0,05 | 0,1    |        | 0,1 |        | 0,2 | 2,5                                                 |
| 2 0,05                          |                                         |             |      |      |        |        |      | 0,2    | 0                |                                       |                                             |           |      |        |        |     | 0,2    | 30  | 5                                                   |
| 3 0,05                          |                                         |             |      |      |        |        |      |        | 50               |                                       |                                             |           |      |        |        |     |        | 5   | 20                                                  |
| 4 0,05                          |                                         |             |      |      |        |        |      |        | 100              |                                       |                                             |           |      |        |        |     |        | 5   | 15                                                  |
| 5 0,05                          |                                         |             |      |      |        |        |      |        | 100              |                                       |                                             |           |      |        |        |     |        | 5   | 10                                                  |
| 6                               |                                         |             |      |      |        |        |      |        | 0                |                                       |                                             |           |      |        |        |     |        | 0   | 5                                                   |
| 7                               |                                         |             |      |      |        |        |      |        | 0                |                                       |                                             |           |      |        |        |     |        | 0   | 0                                                   |
| 8                               |                                         |             |      |      |        |        |      |        | 100              |                                       |                                             |           |      |        |        |     |        | 100 | 100                                                 |
| 9                               |                                         |             |      |      |        |        |      |        | 100              |                                       |                                             |           |      |        |        |     |        | 100 | 100                                                 |
| 10                              |                                         |             |      |      |        |        |      |        | 100              |                                       |                                             |           |      |        |        |     |        | 100 | 100                                                 |

Titerwerte :

Neutralisationsendpunkt bei Serumverdünnung 1:40  
 50%-Titer der direkten KB:  $-\log_{10} = 0,23$  (1:1,7)  
 50%-Neutralisationstiter :  $-\log_{10} = 0,52$  (1:3,3)

+) in Vorversuchen ermittelte optimale Verdünnungen

\*) Spendertiere nach ip bzw. Kontaktinfektion und nachfolgender ic Testinfektion nicht erkrankt, 14 Tage nach letzterer entblutet.

### 3.2.2. Versuche zur Ermittlung der optimalen Inkubationszeit und- temperatur bei der Antigenneutralisation

Ein diesbezüglicher Versuch mit zwei M-IS verschiedener Stärke ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Die Versuchsanordnung war im Prinzip dieselbe wie bei dem Test in Tabelle 1, nur wurden hier die Neutralisationsgemische hinsichtlich der Inkubationszeit und- temperatur unterschiedlich behandelt: Teile der Gemische wurden vergleichsweise 60 Min. bei 37°C, 6 h bei 37°C bzw. 21 h bei +3°C gehalten. Die Kontrollen wurden in Tabelle 2 und den folgenden Tabellen der besseren Übersicht wegen ausgelassen. Sie waren alle einwandfrei.

Aus Tabelle 2 ist zu ersehen, das die mit den beiden M-IS erzielten Ergebnisse nicht einheitlich waren. In beiden Fällen lag der Neutralisations- (Hämolyse- ) Endpunkt in den Röhrchen mit M-IS plus Mee-IS bei 21- stündigem Kühlschrankaufenthalt der Neutralisationsgemische am niedrigsten, während die direkte KB hier am stärksten war. Die 50%- Neutralisationstiter lassen eine sichere Aussage nicht zu. Es war daher erforderlich, weitere M-IS in derselben Weise zu testen und aus den Ergebnissen der verschiedenen Versuche Mittelwerte zu berechnen.

Tabelle 2

Einfluß der Inkubationszeit und -temperatur auf die Antigenneutralisation bei der indirekten Komplementbindung

| Mäuse-<br>immun-<br>serum<br>Nr.                                                                                          | Neu-<br>tral-<br>zeit<br>und<br>-temp.<br>(°C) | Detailergebnisse der IKB-Teste |                                              |    |    |     |     |     |     | 50%-Titer                    |                                |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------|----|----|-----|-----|-----|-----|------------------------------|--------------------------------|
|                                                                                                                           |                                                | Mee-S<br>(1:40)                | Hämolysegrade (%) bei M-IS-<br>Verd. 1:..... |    |    |     |     |     |     | der DKB<br>durch das<br>M-IS | der Ag-<br>Neutrali-<br>sation |
|                                                                                                                           |                                                |                                | 5                                            | 10 | 20 | 40  | 80  | 160 | 320 |                              |                                |
| 1<br>(von<br>NMRI-<br>Mäusen<br>nach<br>ip<br>Pri-<br>mar-<br>infek-<br>tion<br>2 mal<br>hyper-<br>immu-<br>ni-<br>siert) | 60<br>Min.<br>bei<br>37°C                      | Mee-IS <sup>+</sup>            | 25                                           | 25 | 30 | 35  | 45  | 3   | 0   |                              |                                |
|                                                                                                                           |                                                | Mee-NS <sup>*</sup>            | 25                                           | 30 | 55 | 70  | 92  | 100 | 100 | 1,2(1:16)                    |                                |
|                                                                                                                           |                                                | Diff. <sup>++</sup>            | 0                                            | 5  | 25 | 35  | 47  | 97  | 100 |                              | 1,92(1:83)                     |
|                                                                                                                           | 6 h<br>bei<br>37°C                             | Mee-IS <sup>+</sup>            | 25                                           | 30 | 35 | 55  | 65  | 13  | 3   |                              |                                |
|                                                                                                                           |                                                | Mee-NS <sup>*</sup>            | 25                                           | 30 | 55 | 80  | 96  | 100 | 100 | 1,2(1:16)                    |                                |
|                                                                                                                           |                                                | Diff. <sup>++</sup>            | 0                                            | 0  | 20 | 25  | 31  | 87  | 97  |                              | 2,1(1:126)                     |
|                                                                                                                           | 21 h<br>bei<br>+3°C                            | Mee-IS <sup>+</sup>            | 6                                            | 6  | 10 | 10  | 8   | 0   | 0   |                              |                                |
|                                                                                                                           |                                                | Mee-NS <sup>*</sup>            | 6                                            | 6  | 10 | 38  | 90  | 100 | 100 | 1,6(1:40)                    |                                |
|                                                                                                                           |                                                | Diff. <sup>++</sup>            | 0                                            | 0  | 0  | 28  | 82  | 100 | 100 |                              | 1,72(1:52)                     |
|                                                                                                                           | 60<br>Min.<br>bei<br>37°C                      | Mee-IS <sup>+</sup>            | 25                                           | 25 | 25 | 10  | 3   | 0   | 0   |                              |                                |
|                                                                                                                           |                                                | Mee-NS <sup>*</sup>            | 68                                           | 85 | 97 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0,4(1:2,5)                   |                                |
|                                                                                                                           |                                                | Diff. <sup>++</sup>            | 43                                           | 60 | 72 | 30  | 97  | 100 | 100 |                              | 0,85(1:7,1)                    |
| 2<br>(von<br>CBA/J-<br>Mäusen<br>nach<br>Kon-<br>takt-<br>infek-<br>tion<br>1 mal<br>hyper-<br>immu-<br>ni-<br>siert)     | 6 h<br>bei<br>37°C                             | Mee-IS <sup>+</sup>            | 50                                           | 50 | 45 | 38  | 6   | 0   | 0   |                              |                                |
|                                                                                                                           |                                                | Mee-NS <sup>*</sup>            | 63                                           | 85 | 98 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0,46(1:2,9)                  |                                |
|                                                                                                                           |                                                | Diff. <sup>++</sup>            | 13                                           | 35 | 53 | 62  | 94  | 100 | 100 |                              | 1,26(1:18,2)                   |
|                                                                                                                           | 21 h<br>bei<br>+3°C                            | Mee-IS <sup>+</sup>            | 10                                           | 13 | 10 | 3   | 0   | 0   | 0   |                              |                                |
|                                                                                                                           |                                                | Mee-NS <sup>*</sup>            | 20                                           | 40 | 65 | 99  | 100 | 100 | 100 | 1,1(1:12,6)                  |                                |
|                                                                                                                           |                                                | Diff. <sup>++</sup>            | 10                                           | 27 | 55 | 96  | 100 | 100 | 100 |                              | 1,24(1:17,4)                   |

+ dieselben Reagenzien wie in den Röhrchen der Zeile 1 in Tabelle 1.

\* entspricht Zeile 3 in Tabelle 1 ; Werte zeigen direkte KB durch M-IS an.

++ Differenz zwischen den Werten für Mee-IS und Mee-NS; aus ihr wurde der 50%-Titer für die Neutralisation berechnet.

In Tabelle 3 sind die Mittelwerte aus insgesamt 5 Testen, einschließlich der beiden in Tabelle 2 verzeichneten, wiedergegeben. Sie zeigen, daß bezüglich der Neutralisations- (Hämolyse-) Endpunkte kein markanter Unterschied zwischen den verschiedenen Inkubationsarten bestand. Der niedrigste Wert wurde beim Kälteverfahren verzeichnet. Die direkte KB durch das M-IS war am stärksten bei den kühl gehaltenen Gemischen und am schwachsten nach einstündiger Bebrütung bei 37°C. Die Unterschiede zwischen den Neutralisationstitern waren ebenfalls nicht sehr groß. Es scheint jedoch, als ob die Antigenneutralisation mit der Dauer der Inkubation, insbesondere im Wasserbad bei 37°C, an Stärke zugenommen hätte. Relativ am günstigsten schnitt die 6- stündige Bebrütung im Wasserbad bei 37°C ab.

### 3.2.3. Vergleich der Wärme- und Kaltebindung im Komplementbindungsteil des IKB- Testes

Diesbezügliche Versuche sollen hier nur kursorisch erwähnt werden. Sie zeigen, daß bei Kaltebindung (21 h bei +3°C) die direkte Kb stark intensiviert wird und dadurch die Antigenneutralisation verschleiert wird. Außerdem war der Test des öfteren bei Seren von alten immun-toleranten Mäusen nicht durchführbar, weil sie bei der C'- Titration in der Kälte sehr stark antikomplementär wirkten. Bei C'- Titration bei 37°C war dies in viel geringerem Maße der Fall.

Tabelle 3

Mittelwerte aus fünf verschiedenen Versuchen über den Einfluß der Inkubationszeit und -temperatur auf die Antigenneutralisation bei der indirekten Komplementbindung

| Inkubations-<br>zeit und<br>-temperatur | Neutralisa-<br>tions- (Hämo-<br>lyse-) End-<br>punkt bei M-<br>IS-Verdünnung | 50%-Titer der<br>direkten KB bei<br>Wärmebindung<br>(im IKB-Test) | 50%-Neutrali-<br>sationstiter<br>des M-IS   |
|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 60 Min.<br>bei 37°C                     | 2,08 <sup>+</sup><br>(1:120) <sup>++</sup>                                   | 0,49 <sup>+</sup><br>(1:3,1) <sup>++</sup>                        | 1,48 <sup>+</sup><br>(1:30,2) <sup>++</sup> |
| 6 h<br>bei 37°C                         | 2,14<br>(1:138)                                                              | 0,69<br>(1:4,9)                                                   | 1,69<br>(1:49)                              |
| 21 h<br>bei 37°C                        | 2,02<br>(1:105)                                                              | 0,88<br>(1:7,6)                                                   | 1,62<br>(1:41,7)                            |

<sup>+</sup> negativer log<sub>10</sub>

<sup>++</sup> Numerus

### 3.2.4. Bedeutung der Antigenmenge bei der IKB

Es zeigte sich bald, daß die Ergebnisse der IKB in hohem Maße von der Auswahl der richtigen Ag- Dosis abhängen. Dies wird veranschaulicht durch den in Tabelle 4 dargestellten Versuch mit 2 M-IS, in dem steigende Ag- Verdünnungen (1:40 bis 1:120) gegen steigende M-IS- Verdünnungen (1:5 bis 1:640 bzw. 1:160) getestet wurden.

Die errechneten Titerwerte lassen erkennen, daß die direkte KB durch M-IS mit steigender Ag- Verdünnung abnahm (dies war besonders beim starken M-IS der Fall) , während der Neutralisationstiter eine Zunahme erfuhr.

In einem weiteren Versuch dieser Art mit einem M-IS- Gemisch von 2 mal hyperimmunisierten NMRI- Mäusen (identisch mit M-IS Nr. 1 in Tabelle 2) wurden die Ag- Verdünnungen 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:60, 1:80, 1:120, 1:160 gegen unverdünntes M-IS bzw. M-NS und die M-IS bzw. M-NS- Verdünnungen 1:2,5, 1:5, 1:10, 1:20 usf. bis 1:640 getestet. Die mittlere Differenz (angegeben in Abb. 1) zwischen den Hämolysegraden beim M-IS und seinen Verdünnungen sowie den entsprechenden Werten für die direkte KB wurde jeweils in % des Hämolysewertes bei der Röhrchenreihe ausgedrückt, die M-NS und seine Verdünnungen plus V-Ag + Mee-IS enthielt. Diese Reihe entspricht der Zeile 6 in Tabelle 1. Die Umrechnung war nötig, weil die höchste getestete V-Ag- Verdünnung (1:160) in Gegenwart von M-NS und Mee-IS die Hämolyse nur noch zu ungefähr 50% statt 100% bei den niedrigeren V-Ag- Verdünnungen hemmte. Auf diese Weise konnte man auch noch bei der V-Ag- Verdünnung 1:160 Titerwerte berechnen.

Bei noch höheren Verdünnungen war dies nicht mehr möglich.

Die in Abb. 1 wiedergegebene Kurve zeigt, daß die Ag- Neutralisation mit steigender Ag- Verdünnung zunahm. Dieses Resultat bestätigt die in Tabelle 4 registrierten Ergebnisse.

Tabelle 4

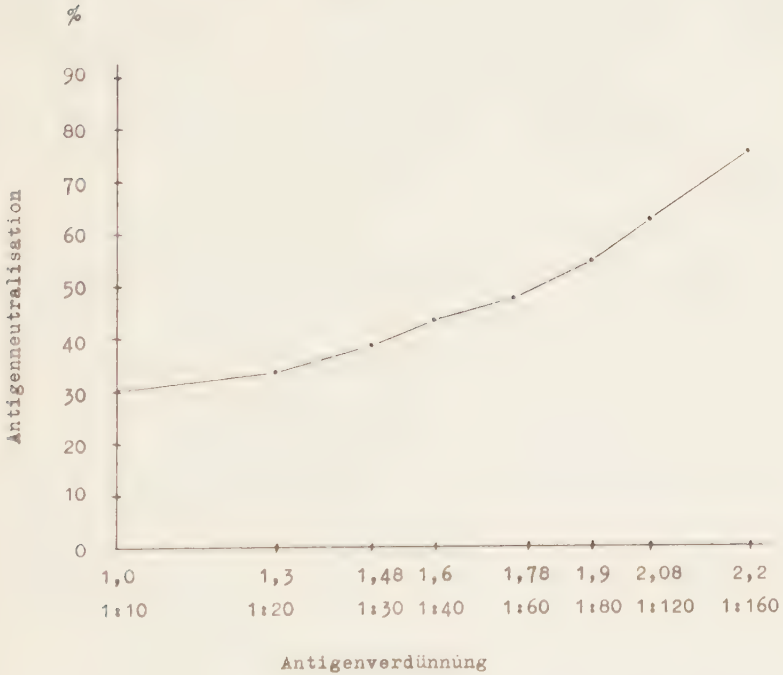
Einfluss der Antigenmenge auf die Antigenneutralisation und die direkte Komple-  
mentbindung durch zwei Mausemmunserien verschiedener Stärke

| Neutral-<br>gemische<br>60 Min.<br><br>37°C |                | Detailergebnisse der IKB-Teste |                                                 |    |     |     |     |     |     | 50%-Titer                          |                                  |
|---------------------------------------------|----------------|--------------------------------|-------------------------------------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|------------------------------------|----------------------------------|
| M-S                                         | V-Ag-<br>Verd. | Mee-S<br>(1:40)                | Hämolysegrade (%) bei den<br>M-IS-Verd. 1:..... |    |     |     |     |     |     | der direk-<br>ten KB<br>durch M-IS | der V-Ag-<br>Neutrali-<br>sation |
|                                             |                |                                | 5                                               | 10 | 20  | 40  | 80  | 160 | 320 | 640                                |                                  |
| +<br>M-IS "stark"                           | 1: 40          | Mee-<br>IS                     | 10                                              | 10 | 10  | 5   | 3   | 0   | 0   | 0                                  | 1,60(1:40)                       |
|                                             | 1: 60          |                                | 10                                              | 15 | 15  | 15  | 5   | 0   | 0   | 0                                  | 1,66(1:46)                       |
|                                             | 1: 80          |                                | 13                                              | 15 | 15  | 20  | 10  | 3   | 0   | 0                                  | 1,66(1:46)                       |
|                                             | 1:120          |                                | 55                                              | 55 | 55  | 60  | 55  | 40  | 10  | 5                                  | 1,98(1:95)                       |
|                                             | 1: 40          | Mee-<br>NS                     | 0                                               | 3  | 5   | 55  | 100 | 100 | 100 | 100                                | 1,56(1:36)                       |
|                                             | 1: 60          |                                | 10                                              | 10 | 13  | 55  | 99  | 100 | 100 | 100                                | 1,56(1:36)                       |
|                                             | 1: 80          |                                | 13                                              | 13 | 20  | 60  | 98  | 100 | 100 | 100                                | 1,52(1:33)                       |
|                                             | 1:120          |                                | 20                                              | 50 | 60  | 80  | 98  | 100 | 100 | 100                                | 1,14(1:14)                       |
| +<br>M-IS "schwach"                         | 1: 40          | Mee-<br>IS                     | 5                                               | 3  | 0   | 0   | 0   | 0   |     |                                    | 0,80(1:6,3)                      |
|                                             | 1: 60          |                                | 10                                              | 5  | 3   | 0   | 0   | 0   |     |                                    | 0,81(1:6,5)                      |
|                                             | 1: 80          |                                | 15                                              | 10 | 5   | 0   | 0   | 0   |     |                                    | 0,79(1:6,2)                      |
|                                             | 1:120          |                                | 60                                              | 50 | 25  | 4   | 3   | 3   |     |                                    | 1,05(1:11,2)                     |
|                                             | 1: 40          | Mee-<br>NS                     | 40                                              | 85 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100                                | 0,77(1:5,8)                      |
|                                             | 1: 60          |                                | 42                                              | 85 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100                                | 0,75(1:5,6)                      |
|                                             | 1: 80          |                                | 55                                              | 85 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100                                | 0,64(1:4,4)                      |
|                                             | 1:120          |                                | 85                                              | 95 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100                                |                                  |
| +<br>M-IS "stark"                           | 1: 40          | Mee-<br>IS                     | 0                                               |    |     |     |     |     |     |                                    |                                  |
|                                             | 1: 60          |                                | 0                                               |    |     |     |     |     |     |                                    |                                  |
|                                             | 1: 80          |                                | 0                                               |    |     |     |     |     |     |                                    |                                  |
|                                             | 1:120          |                                | 5                                               |    |     |     |     |     |     |                                    |                                  |
|                                             | 1: 40          | Mee-<br>NS                     | 100                                             |    |     |     |     |     |     |                                    |                                  |
|                                             | 1: 60          |                                | 100                                             |    |     |     |     |     |     |                                    |                                  |
|                                             | 1: 80          |                                | 100                                             |    |     |     |     |     |     |                                    |                                  |
|                                             | 1:120          |                                | 100                                             |    |     |     |     |     |     |                                    |                                  |

<sup>+</sup>) alle Sera stammten von CBA/J-Mäusen;  
M-IS "stark": Spendertiere nach pl Primär-  
infektion 6 mal (ic 1 mal; ip 6 mal) hyper-  
immunisiert.  
M-IS "schwach": Spendertiere am 28. Tag nach  
pl Infektion entblutet (Rekonvaleszentenserum)

Abb. 1

Einfluß der Antigenmenge auf die Antigenneutralisation bei  
der indirekten Komplementbindung durch Mäuseimmunserum



3.2.5. Antikörpernachweis durch IKB im Vergleich mit der direkten KB

(Kältebindung) in Seren von immunen, nicht toleranten Mäusen

In den in Tabelle 5 verzeichneten Testen wurden Sera von NMRI- bzw. CBA/J- Mäusen geprüft, die zum Teil nach der Primärinfektion hyperimmunisiert wurden. Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß der Antikörpernachweis bei sämtlichen Immunseren gelang. Als mittlerer Titer wurden für die Sera 1 bis 6 und 8 folgende Verdünnungen ermittelt: als Neutralisations- (Hämolyse- ) Endpunkt 1:49; als 50%- Titer der direkten KB (Wärmebindung) 1:4,2; als 50%- Neutralisationstiter 1:14,9; als 50%- Titer der direkten KB (Kältebindung) 1:31,9.

Die Spendertiere der in Tabelle 6 wiedergegebenen Tests waren 10 nicht tolerante NMRI- Mäuse und zwar Muttertiere, die von ihren neonatal mit dem Stamm "W" infizierten Säuglingen angesteckt worden waren. Die Mäuse 5 und 6 wurden 14 Tage vor dem Entbluten einer i.c. Testinfektion unterzogen. Die Tabelle zeigt, daß der Neutralisations- (Hämolyse- ) Endpunkt bei 9 Einzelseren ermittelt werden konnte, der 50%- Titer der direkten KB (Wärmebindung) hingegen nur bei 6 Tieren und der 50%- Neutralisationstiter ebenfalls nur bei 6 Tieren. Dagegen ergab die direkte KB in der Kälte bei allen 10 Mäusen meßbare Werte.

Ähnliche Ergebnisse lieferte der in Tabelle 7 dargestellte Versuch mit 12 Einzelseren von nicht toleranten Muttermäusen des CBA/J- Stammes, die ebenfalls eine Kontaktinfektion durch ihre neonatal mit dem Stamm "W" infizierten Babymäuse durchgemacht hatten. Hier konnten die Neutralisations- (Hämolyse- ) Endpunkte sowie die 50%-KB- Titer bei Kältebindung bei sämtlichen Seren bestimmt werden. Die Berechnung der

Mittelwerte ergab die Serumverdünnung 1:10 für den Neutralisations- (Hämolyse- ) Endpunkt und die Verdünnung 1:23,8 als 50%- Titer der direkten KB in der Kälte.

Bei 8 Mäusen (Nr. 1 bis 3, 6 bis 9 und 11) war es möglich, sämtliche Titerwerte zu vergleichen und Mittelwerte zu berechnen. Diese waren die Serumverdünnungen 1:15,4 als Neutralisations- (Hämolyse- ) Endpunkt; 1:2,7 als 50%- Titer der direkten KB (Wärme) ; 1:6,0 als 50%- Neutralisationstiter und 1:37,4 als 50%- Titer der direkten KB (Kälte) .

Schließlich wurden aus dem gesamten, in den Tabellen 5-7 registrierten Material von nicht toleranten immunen Mäusen streng vergleichbare Titer- Mittelwerte berechnet:

|                                                                    |          |
|--------------------------------------------------------------------|----------|
| Für den Neutralisations- (Hämolyse- ) Endpunkt die Serumverdünnung | 1:28     |
| " " 50%- Titer der DKB (Wärmebindung)                              | " " 1: 5 |
| " " 50%- Neutralisationstiter                                      | " " 1:11 |
| " " 50%- Titer der DKB (Kältebindung)                              | " " 1:41 |

Tabelle 5

Ergebnisse der IKB und der direkten Agglutination (Aggl.) mit Serumbestanden  
von 1000 Titerstufen Mäusen, die auf verschiedene Weise immunisiert wurden.

| M-S<br>Nr. | Serumspender           |                                                        | IKB-Test                                                                       |                                                                         |                                                      | 50%-Titer<br>des M-S im<br>direkten<br>KE-Test bei<br>Kalte-<br>bindung |
|------------|------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
|            | Man-<br>se-<br>stamm   | Immunisierung                                          | Neutrali-<br>sations-<br>(Hemo-<br>lyse-)<br>End-<br>punkt<br>bei M-S<br>Verd. | 50%-Titer<br>der direk-<br>ten KE<br>durch M-S<br>bei Wärme-<br>bindung | 50%-<br>Neutrali-<br>sations-<br>titer<br>des<br>M-S |                                                                         |
| 1          | MSI                    | nach ip Primarin-<br>fektion 2 mal<br>hyperimmunisiert | 1: 80                                                                          | 0,90<br>(1:7,9)                                                         | 1,51<br>(1:32,4)                                     | 2,07<br>(1:117)                                                         |
| 2          | "                      | nach ip Primarin-<br>fektion 1 mal<br>hyperimmunisiert | 1: 160                                                                         | 3,10<br>(1:1,3)                                                         | 1,70<br>(1:50,1)                                     | 2,04<br>(1:110)                                                         |
| 3          | "                      | am 21. Tag nach<br>ip Infektion<br>entblutet           | 1: 80                                                                          | 0,90<br>(1:7,9)                                                         | 1,10<br>(1:12,6)                                     | 1,42<br>(1:26,3)                                                        |
| 4          | CSA J                  | nach ipl Erst-<br>infektion 6 mal<br>hyperimmunisiert  | 1: 80                                                                          | 1,0<br>(1:10)                                                           | 1,39<br>(1:24,6)                                     | 1,60<br>(1:39,8)                                                        |
| 5          | "                      | nach ipl Erst-<br>infektion 1 mal<br>hyperimmunisiert  | 1: 40                                                                          | 0,82<br>(1:6,6)                                                         | 0,90<br>(1:7,9)                                      | 1,30<br>(1:20)                                                          |
| 6          | "                      | nach ipl Erst-<br>infektion 1 mal<br>hyperimmunisiert  | 1: 20                                                                          | 0,0<br>(1:1)                                                            | 0,82<br>(1:6,6)                                      | 0,88<br>(1:7,1)                                                         |
| 7          | "                      | nach Kontakt-<br>infektion 1 mal<br>hyperimmunisiert   | 1: 80                                                                          | 0,40<br>(1:2,5)                                                         | 0,85<br>(1:7,1)                                      | nicht<br>ermittelt                                                      |
| 8          | "                      | am 28. Tag nach<br>plantare Infek-<br>tion entblutet   | 1: 10                                                                          | 0,64<br>(1:4,4)                                                         | 0,79<br>(1:6,2)                                      | 1,25<br>(1:18)                                                          |
|            | CSA, J-<br>und<br>MSI- | Normalserum                                            | > 1: 1                                                                         | < 0<br>(1)                                                              | < 0<br>(1)                                           | < 0<br>(1)                                                              |

Tabelle 6

Ergebnisse der IKB und der direkten KB (Kaltebindung) bei Seren von nicht toleranten Muttermäusen des NMRI-Stammes nach Kontaktinfektion durch neonatal infizierte Säuglingsmäuse

| Muttermaus<br>Nr. | Blutentnahme<br>(Tage nach neonataler Infektion der Säuglinge) | IKB-Test                                             |                                                                    |                                  | 50%-KB-titer im direkten KB-Test bei Kaltebindung (in separatem Test) |
|-------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
|                   |                                                                | Neutralisations- (Hämolysen-) Endpunkt bei M-S-Verd. | 50%-Titer der direkten KB durch M-S bei Wärmebindung (im IKB-Test) | 50%-Neutralisationstiter des M-S |                                                                       |
| 1                 | 39                                                             | 1: 10                                                | <0,70 (> 1:5)                                                      | <0,70 (> 1:5)                    | 0,83 (1: 6,8)                                                         |
| 2                 | 37                                                             | 1:160                                                | 1,30 (1:20)                                                        | 1,60 (1:39,8)                    | 1,95 (1:89,1)                                                         |
| 3                 | 37                                                             | 1: 40                                                | 1,11 (1:12,9)                                                      | 1,20 (1:15,9)                    | 1,78 (1:60,3)                                                         |
| 4                 | 35                                                             | 1: 10                                                | <0,70 (> 1:5)                                                      | <0,70 (> 1:5)                    | 0,75 (1: 5,6)                                                         |
| 5 <sup>+</sup>    | 59                                                             | 1: 20                                                | 1,14 (1:13,8)                                                      | 1,17 (1:14,8)                    | 1,75 (1:56,2)                                                         |
| 6 <sup>+</sup>    | 57                                                             | 1: 20                                                | 1,11 (1:12,9)                                                      | 1,16 (1:14,5)                    | 1,74 (1:55,0)                                                         |
| 7 <sup>*</sup>    | s.u.                                                           | 1: 10                                                | 0,89 (1: 7,8)                                                      | 0,96 (1: 9,1)                    | 1,48 (1:30,2)                                                         |
| 8                 | 63                                                             | 1: 2,5                                               | <0,40 (> 1:2,5)                                                    | <0,40 (> 1:2,5)                  | 0,84 (1: 6,9)                                                         |
| 9                 | 61                                                             | 1: 40                                                | 1,40 (1:25,1)                                                      | 1,42 (1:26,3)                    | 2,04 (1:110)                                                          |
| 10                | 39                                                             | > 1: 2,5                                             | <0,40 (> 1:2,5)                                                    | <0,40 (> 1:2,5)                  | 0,60 (1: 4,0)                                                         |
| NMRI-Normalser.   |                                                                | > 1: 2,5                                             | <0,40 (> 1:2,5)                                                    | <0,40 (> 1:2,5)                  | <0 (1)                                                                |

<sup>+</sup>) 14 Tage vor der Blutentnahme wurden die Mütter intracerebral auf Immunität geprüft; sie erkrankten nicht.

<sup>\*</sup>) dieses Tier hatte zwei Würfe, die jeweils neonatal infiziert wurden; die Blutentnahme bei der Mutter erfolgte 70 Tage nach Geburt des 1. bzw. 49 Tage nach Geburt des 2. Wurfes.

Tabelle 7

Ergebnisse der IKB und der direkten KB (Kaltebindung) bei Seren von nicht toleranten Muttermäusen des CBA/J-Stammes nach Kontaktinfektion durch neonatal infizierte Säuglingsmäuse

| Muttermaus<br>Nr. | Blut-<br>entnahme<br>(Tage<br>nach neo-<br>nataler<br>Infektion<br>der Säug-<br>linge) | IKB-Test                                                                  |                                                                                |                                             | 50%-KB-Titer im<br>direkten KB-<br>Test bei Kälte-<br>bindung<br>(in separatem<br>Test) |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
|                   |                                                                                        | Neutrali-<br>sations-<br>(Hämo-<br>lyse-)<br>Endpunkt<br>bei<br>M-S-Verd. | 50%-Titer der<br>direkten KB<br>durch M-S bei<br>Wärmebindung<br>(im IKB-Test) | 50%-Neutrali-<br>sationstiter<br>des<br>M-S |                                                                                         |
| 1                 | 52                                                                                     | 1:20                                                                      | 0,64 (1:4,4)                                                                   | 0,85 (1:7,1)                                | 1,50 (1:32)                                                                             |
| 2                 | 52                                                                                     | 1:40                                                                      | 0,70 (1:5,0)                                                                   | 1,27 (1:18,6)                               | 1,83 (1:67,6)                                                                           |
| 3                 | 49                                                                                     | 1:10                                                                      | 0,13 (1:1,35)                                                                  | 0,60 (1:4,0)                                | 1,46 (1:28,8)                                                                           |
| 4                 | 46                                                                                     | 1: 5                                                                      | < 0 (1)                                                                        | 0,14 (1:1,4)                                | 1,24 (1:17,4)                                                                           |
| 5                 | 42                                                                                     | 1: 5                                                                      | < 0 (1)                                                                        | < 0 (1)                                     | 1,10 (1:12,6)                                                                           |
| 6                 | 39                                                                                     | 1:20                                                                      | 0 (1:1)                                                                        | 0,76 (1:5,8)                                | 1,70 (1:50,1)                                                                           |
| 7                 | 33                                                                                     | 1:10                                                                      | 0,54 (1:3,5)                                                                   | 0,67 (1:4,7)                                | 1,52 (1:33,1)                                                                           |
| 8                 | 33                                                                                     | 1:20                                                                      | 0,64 (1:4,4)                                                                   | 0,82 (1:6,6)                                | 1,70 (1:50,1)                                                                           |
| 9                 | 33                                                                                     | 1:10                                                                      | 0,53 (1:3,4)                                                                   | 0,64 (1:4,4)                                | 1,43 (1:26,9)                                                                           |
| 10                | 33                                                                                     | 1: 5                                                                      | < 0 (1)                                                                        | 0,06 (1:1,1)                                | 0,90 (1: 7,9)                                                                           |
| 11                | 29                                                                                     | 1:10                                                                      | 0,26 (1:1,8)                                                                   | 0,59 (1:3,9)                                | 1,45 (1:28,2)                                                                           |
| 12                | 29                                                                                     | 1: 2,5                                                                    | < 0 (1)                                                                        | < 0 (1)                                     | 0,70 (1: 5)                                                                             |
| CBA/J-Normalser.  |                                                                                        | > 1:1                                                                     | < 0 (1)                                                                        | < 0 (1)                                     | < 0 (1)                                                                                 |

### 3.2.6. Verhalten von Mäuse- Normalseren bei der IKB

Insbesondere bei der Prüfung von negativ oder sehr schwach positiv reagierenden M-IS, wie sie vor allem bei persistent infizierten, immunroleranten Mäusen zu erwarten waren, war es wichtig, die Reaktionsweise normaler M-S genau zu kennen. Deshalb wurde eine Reihe von M-NS - zum Teil handelte es sich um Serumgemische von mehreren Tieren verschiedener Altersstufen - unverdünnt in IKB- Testen geprüft.

Insgesamt wurden 7 Serumgemische und 29 Einzelseren von normalen NMRI-Mäusen getestet, von denen die letzteren negativ reagierten. Zwei Gemische ergaben sehr schwach positive Reaktion, d.h. , in den dem Röhrchen Nr. 6 in Tabelle 1 entsprechenden Röhrchen mit unverdünntem Serum war nach Sedimentierung der Erythrozyten sehr schwache, 3- bzw. 5%- ige Hämolyse zu erkennen, die jedoch bei der M-NS- Verdünnung 1:2,5 nicht mehr in Erscheinung trat.

Von 18 M-NS von CBA/J- Mäusen, darunter 2 Serumgemische und 16 Einzelseren, reagierten die letzteren ebenfalls negativ. Bei einem der beiden Gemische wurde wiederum nur im Röhrchen mit unverdünntem Serum etwa 5%- ige Hämolyse festgestellt. Auch hier wurde der verantwortliche Faktor sehr rasch ausverdünnt, da schon bei der M-NS- Verdünnung 1:2,5 keine Hämolyse mehr zu erkennen war.

3.2.7. Reaktionsweise von Serungemischen und Einzelseren von persistent (kongenital) infizierten NMRI- Mäusen verschiedenen Alters in der IKB und der DKB in der Kälte

Wie bereits erwähnt, konnten von einzelnen Mäusen, besonders von solchen des CBA/J- Stammes, oft nur kleine Serummengen gewonnen werden, die für beide Testarten mit allen Kontrollen nicht ausgereicht hätten. Daher wurde in einem Vorversuch die Frage geprüft, ob bei Seren, die unverdünnt im IKB- Test mehr oder weniger stark positiv reagierten, auf die Serumtitration und die direkte KB (Wärmebindung) verzichtet werden kann oder nicht; im positiven Fall würde dies eine Einsparung von Serum ermöglichen.

Zu diesem Zweck wurden 16 Sera von toleranten NMRI- Mäusen ausgewählt, die unverdünnt im IKB- Test positiv reagiert hatten (3 bis 72%- ige Hämolyse im Röhrchen mit unverdünntem Serum) . Nach dem Ergebnis dieses Vorversuches muß die Serumtitration durchgeführt werden bei Seren, die unverdünnt Hämolysewerte über 40% ergeben. In solchen Fällen (4 von 17 Seren) ergab die Serumverdünnung 1:2,5 jedoch höchstens noch 5%- ige Hämolyse, während bereits bei der Verdünnung 1:5 keine Hämolyse mehr festzustellen war. Die hier wirksamen Antikörper konnten also sehr rasch ausverdünnt werden, gleichgültig, ob im Röhrchen mit unverdünntem Serum relativ starke Hämolyse erkennbar war oder nicht.

Im direkten KB- Test bei Wärmebindung reagierten alle 16 Sera negativ. Dies war auch in anderen Versuchen der Fall, so daß auf die direkte KB in der Wärme bei Seren von immuntoleranten Mäusen verzichtet werden kann.

In dem in Tabelle 8 verzeichneten Versuch wurden 28 Serumgemische sowie 21 Einzelseren von persistent infizierten, immuntoleranten NMRI- Mäusen vergleichsweise im IKB- Test und im direkten KB- Test bei Kältebindung geprüft. In beiden Testen wurde unverdünntes Serum verwendet. In der Tabelle ist jeweils auch das Alter der Seruspender zur Zeit der Blutentnahme vermerkt. Zahlreiche Gemische enthielten Seren von Mäusen verschiedener Altersstufen, da bei der Herstellung der Pools primär andere Gesichtspunkte als das Lebensalter maßgebend gewesen waren.

Aus Tabelle 8 ist zu ersehen, daß im IKB- Test 16 Gemische mehr oder weniger stark positiv reagierten. Bei den Einzelseren traf dies in 9 Fällen zu. Im direkten KB- Test in der Kälte waren 19 Serumgemische und 14 Einzelsera mehr oder weniger stark positiv.

Bei den meisten Seren bestand kein strenger Parallelismus zwischen den Ergebnissen der beiden Testarten. Markante Fälle, für die dies zutrifft, sind Sera Nr. 10, 18, 21, 22, 30, 31, 38, 40, 42, 44, 47 und 48. Ein besonders krasser Fall ist das Serum Nr. 30, das bei der IKB negativ, in der DKB dagegen verhältnismäßig stark positiv reagierte. Sein 50%-Titer bei der Kaltebindung war die Serumverdünnung 1:4 (bezogen auf eine Serumdosis von 0,05 ml wie bei der IKB) .

#### 3.2.8. Altersmäßige Verteilung der IKB- positiven, immuntoleranten NMRI-

##### Mäuse

Insgesamt wurden 55 Einzelseren von solchen Mäusen verschiedener Altersstufen unverdünnt im IKB- Test geprüft. Wie die Tabelle 9 zeigt, fiel die große Mehrzahl der positiven Fälle in die Altersspanne 2 (121 bis

240 Tage) .

3.2.9. Prüfung von Serungemischen und Einzelseren von persistent  
(kongenital) infizierten CBA/J- Mäusen verschiedener Alters-  
stufen im IKB- Test

Die Zahl der getesteten Serungemische und Einzelsera sowie das Lebensalter der Serumspender sind aus der Tabelle 10 zu ersehen. Die Sera wurden jeweils unverdünnt geprüft. Im Gegensatz zu den Seren von kongenital infizierten NMRI- Mäusen reagierten die CBA/J- Seren ausnahmslos negativ.

Tabelle 8

Vergleich der Ergebnisse der indirekten Komplementbindung und der direkten Kaltebindung bei Serumgemischen und Einzelseren von persistent infizierten NMRI-Mäusen

| Serumgemische (unverdünnt) |      |                                    |                       |                       | Einzelsera (unverdünnt) |                                                     |                       |                       |
|----------------------------|------|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Serumspender               |      |                                    | IKB                   | DKB                   | lfde. Nr.               | Alter der Serumspen- z.Z. der Blutent- nahme (Tage) | IKB                   | DKB                   |
| lfde. Nr.                  | Zahl | Alter 2.2. der Blut- entnahme Tage | Hemo- lyse- grade (%) | Hemo- lyse- grade (%) |                         |                                                     | Hemo- lyse- grade (%) | Hemo- lyse- grade (%) |
| 1                          | 5    | 21                                 | 0                     | 100                   | 29                      | 21                                                  | 0                     | 100                   |
| 2                          | 4    | 28                                 | 0                     | 100                   | 30                      | 91                                                  | 0                     | 0                     |
| 3                          | 55   | 28-40                              | 0                     | 94                    | 31                      | 151                                                 | 7                     | 6                     |
| 4                          | 2    | 65; 67                             | 3                     | 94                    | 32                      | 170                                                 | 6                     | 100                   |
| 5                          | 12   | 66-117                             | 0                     | 87                    | 33                      | 183                                                 | 15                    | 87                    |
| 6                          | 5    | 71-108                             | 17                    | 88                    | 34                      | 193                                                 | 0                     | 100                   |
| 7                          | 8    | "                                  | 8                     | 94                    | 35                      | 194                                                 | 3                     | 100                   |
| 8                          | 2    | "                                  | 20                    | 94                    | 36                      | 201                                                 | 13                    | 100                   |
| 9                          | 8    | "                                  | 12                    | 94                    | 37                      | 208                                                 | 0                     | 100                   |
| 10                         | 8    | "                                  | 72                    | 75                    | 38                      | 222                                                 | 60                    | 100                   |
| 11                         | 8    | "                                  | 6                     | 94                    | 39                      | 262                                                 | 35                    | 25                    |
| 12                         | 3    | 73-117                             | 0                     | 94                    | 40                      | 296                                                 | 0                     | 6                     |
| 13                         | 8    | 91-119                             | 5                     | 94                    | 41                      | 347                                                 | 0                     | 94                    |
| 14                         | 5    | 92-119                             | 0                     | 94                    | 42                      | 354                                                 | 0                     | 75                    |
| 15                         | 5    | 125                                | 0                     | 100                   | 43                      | 365                                                 | 0                     | 91                    |
| 16                         | 10   | 111-154                            | 15                    | 6                     | 44                      | 365                                                 | 5                     | 25*                   |
| 17                         | 10   | "                                  | 60                    | 13                    | 45                      | 367                                                 | 7                     | 87                    |
| 18                         | 10   | 122-134                            | 25                    | 100                   | 46                      | 371                                                 | 0                     | 94                    |
| 19                         | 10   | "                                  | 40                    | 13                    | 47                      | 371                                                 | 0                     | 96                    |
| 20                         | 8    | 118-208                            | 0                     | 100                   | 48                      | 374                                                 | 0                     | 90                    |
| 21                         | 5    | 126-180                            | 20                    | 94                    | 49                      | 385                                                 | 50                    | 75                    |
| 22                         | 11   | 134-190                            | 17                    | 100                   | Mause-Normalser.        |                                                     |                       |                       |
| 23                         | 12   | 180-210                            | 5                     | 100                   |                         |                                                     | 0                     | 100                   |
| 24                         | 13   | 150-372                            | 0                     | 94                    |                         |                                                     |                       |                       |
| 25                         | 2    | 216; 247                           | 0                     | 100                   |                         |                                                     |                       |                       |
| 26                         | 4    | 221-241                            | 0                     | 100                   |                         |                                                     |                       |                       |
| 27                         | 5    | 215-306                            | 0                     | 87                    |                         |                                                     |                       |                       |
| 28                         | 9    | 235-309                            | 13                    | 94                    |                         |                                                     |                       |                       |
| Mause-Normalserum          |      |                                    | 0                     | 100                   |                         |                                                     |                       |                       |

\*) bei einer Verdünnung von 1:2

Tabelle 9

Einfluß des Lebensalters auf die Reaktionsweise von Seren von persistent infizierten NMRI-Mäusen im IKB-Test

| Altersspanne<br>(Tage)             | Zahl der unverdünnt ge-<br>prüften Einzelseren |                  | Mittelwerte der Hämolysegrade (%) bezogen<br>auf |                   |
|------------------------------------|------------------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------|-------------------|
|                                    | getestet                                       | davon<br>positiv | getestete<br>Seren                               | positive<br>Seren |
| 0 - 120<br>arithmet.<br>Mittel: 46 | 10                                             | 0                | 0                                                | 0                 |
| 121 - 240<br>Mittel: 186           | 16                                             | 14               | 28                                               | 32                |
| 241 - 389<br>Mittel: 357           | 29                                             | 4                | 4                                                | 28                |

Tabelle 10

Ergebnisse der indirekten Komplementbindung mit unverdünnten Serumgemischen bzw. Einzelseren von persistent infizierten CBA/J-Mäusen verschiedenen Alters

| Irfde.<br>Nr. | Serumspender |                 | IKB<br>Hämolyse-<br>grad (%) | Irfde.<br>Nr. | Serumspender |                 | IKB<br>Hämolyse-<br>grad (%) |
|---------------|--------------|-----------------|------------------------------|---------------|--------------|-----------------|------------------------------|
|               | Zahl         | Alter<br>(Tage) |                              |               | Zahl         | Alter<br>(Tage) |                              |
| 1             | 4            | 25              | 0                            | 26            | 15           | 274             | 0                            |
| 2             | 2            | 33              | 0                            | 27            | 6            | 272-278         | 0                            |
| 3             | 4            | 33              | 0                            | 28            | 3            | 286             | 0                            |
| 4             | 15           | 36              | 0                            | 29            | 5            | 307             | 0                            |
| 5             | 2            | 37-43           | 0                            | 30            | 4            | 318             | 0                            |
| 6             | 4            | 37-43           | 0                            | 31            | 10           | 334             | 0                            |
| 7             | 7            | 60-70           | 0                            | 32            | 10           | 350             | 0                            |
| 8             | 12           | 76              | 0                            | 33            | 4            | 355             | 0                            |
| 9             | 2            | 76              | 0                            | 34            | 4            | 396             | 0                            |
| 10            | 14           | 76              | 0                            | 35            | 18           | 415             | 0                            |
| 11            | 9            | 138             | 0                            | 36            | 1            | 26              | 0                            |
| 12            | 23           | 152             | 0                            | 37            | 1            | 26              | 0                            |
| 13            | 9            | 168             | 0                            | 38            | 1            | 36              | 0                            |
| 14            | 16           | 183             | 0                            | 39            | 1            | 36              | 0                            |
| 15            | 5            | 206             | 0                            | 40            | 1            | 279             | 0                            |
| 16            | 3            | 213             | 0                            | 41            | 1            | 365             | 0                            |
| 17            | 6            | 219             | 0                            | 42            | 1            | 365             | 0                            |
| 18            | 3            | 220-221         | 0                            | 43            | 1            | 365             | 0                            |
| 19            | 5            | 231-236         | 0                            | 44            | 1            | 365             | 0                            |
| 20            | 6            | 238             | 0                            | 45            | 1            | 365             | 0                            |
| 21            | 13           | 244             | 0                            | 46            | 1            | 365             | 0                            |
| 22            | 5            | 261-262         | 0                            | 47            | 1            | 365             | 0                            |
| 23            | 4            | 264             | 0                            | 48            | 1            | 366             | 0                            |
| 24            | 4            | 268             | 0                            |               |              |                 |                              |
| 25            | 5            | 269             | 0                            |               |              |                 |                              |

#### 4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Der IKB- Test stellt insofern eine komplizierte serologische Reaktion dar, als die Reaktionsgemische zwei verschiedene Immunseren neben dem Ag und dem C' enthalten. Die Vorgänge, die sich hierbei abspielen, sind im einzelnen noch nicht genau bekannt. Tatsache ist, daß in geeigneten Systemen das zu untersuchende (hemmende) Serum, das zuerst mit dem Ag in Berührung kommt, dieses neutralisiert, sodaß das später gleichzeitig mit dem C' zugesetzte Indikatorserum zusammen mit dem Ag das C' nicht binden kann.

Der Test ist technisch leicht durchführbar, wenn das zu untersuchende Serum selbst keine komplementbindenden Eigenschaften besitzt, wie dies z.B. bei Immunseren von Hühnern gegen die Newcastle- Krankheit (36) oder bei Immunseren von Rindern gegen die Maul- und Klauenseuche (33, 34) der Fall ist. Schwierigkeiten entstehen dann, wenn dies nicht so ist, so z.B. bei Immunseren von Schafen gegen die Maul- und Klauenseuche. Traub und Mitarbeiter (mündliche Mitteilung) versuchten, sie dadurch zu umgehen, daß sie die Serumtiter aus der Differenz der Hämolysegrade bei der IKB und der parallel laufenden DKB errechneten. Da eine bessere, mit weniger Fragezeichen versehene Methode noch nicht bekannt ist, wurde dieses Verfahren für die vorliegenden Versuche mit Seren von LCM- immunen Mäusen übernommen. Ihm liegt die Annahme zugrunde, daß die Antikörper im M-IS auch nach eventueller Bindung an das V-Ag im Neutralisationsgemisch und nach späterem Zusatz von Mee-IS ihre komplementbindenden Eigenschaften beibehalten.

Obwohl die Versuche über die günstigste Inkubationszeit und -temperatur bei der Ag- Neutralisation eine leichte Überlegenheit der 6- stündigen Bebrütung bei  $37^{\circ}\text{C}$  erkennen ließen, wurde der einstündigen Bebrütung bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad aus technischen Gründen der Vorzug gegeben. Sie paßt besser in ein Tagesprogramm und bietet einen gewissen Vorteil insofern, als die störende direkte KB durch das M-IS hierbei relativ am schwächsten ist.

Eindeutig waren die Ergebnisse der die optimale Ag- Menge im IKB- Test betreffenden Versuche. Aus ihnen kann man schließen, daß relativ geringe Ag- Konzentrationen deswegen günstiger sind, weil in ihrer Gegenwart die DKB schwächer und die Neutralisation deutlicher erkennbar ist als bei konzentrierterem Ag. Die in Abb. 1 enthaltene Kurve stellt vermutlich ein Teilstück einer Gauß'schen Normalverteilungskurve dar, deren oberes Ende im Bereich nicht mehr meßbarer Werte liegt. Die Ag- Gebrauchsdosis in Testen, in denen die Ag- Konzentration nicht variiert wurde, wurde daher so bemessen, daß sie deutlich erkennbare Ag- Neutralisation erlaubte, aber in Gegenwart von M-NS noch vollständige KB mit Mee-IS ergab.

Mit Hilfe der IKB gelang es mit einer einzigen Ausnahme (Maus 10 in Tabelle 6), sowohl in Serien von hyperimmunisierten, nicht toleranten Mäusen als auch in Rekonvaleszentenseren regelmäßig Antikörper nachzuweisen. Wenn es auch nicht in allen Fällen möglich war, sämtliche Titerwerte zu berechnen, so konnte man mit der erwähnten Ausnahme doch stets den Neutralisations- (Hämolyse-) Endpunkt in den höheren mit steigenden M-IS- Verdünnungen, V-Ag und Mee-IS erkennen. Zwischen nicht

toleranten NMRI- und CBA/J- Mäusen schien bezüglich des Antikörperbildungsvermögens kein wesentlicher Unterschied zu bestehen. Die aus sämtlichen Testen errechneten Mittelwerte der Neutralisationstiter lagen nahezu doppelt so hoch wie die mittleren IKB- Titer bei Wärmebindung.

Dagegen wurden bei der vergleichsweise durchgeführten direkten Kältebindung bei der Mehrzahl der Sera höhere Titerwerte gemessen als bei der IKB. Demnach scheint sich die direkte Kältebindung zum Antikörpernachweis bei nicht toleranten immunen Tieren besser zu eignen als die IKB. Letztere hat jedoch den Vorzug, daß mit ihrer Hilfe Ag- neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden können, die vielleicht auch bei der Neutralisation des infektiösen Virus eine gewisse Rolle spielen.

Die mit Seren von persistent infizierten, immuntoleranten Mäusen durchgeführten Tests ließen den großen Unterschied im Antikörperbildungsvermögen zwischen immuntoleranten und nicht toleranten Tieren klar erkennen. In einer Reihe von Serungemischen und Einzelseren von toleranten NMRI- Mäusen konnten im unverdünnten Serum mittels der IKB geringe Mengen von Ag- neutralisierenden Antikörpern nachgewiesen werden. Interessanterweise fiel die Mehrzahl der positiven Einzelmäuse in eine bestimmte Altersgruppe (5 bis 6 Monate) . In der Altersspanne von 1 bis 4 Monaten wurden positive Tiere überhaupt nicht und in der Spanne von 9 bis 13 Monaten nur in geringer Zahl festgestellt.

Die unterschiedliche Reaktionsweise zahlreicher Sera bei der IKB und der parallel laufenden direkten Kaltebindung legt die Vermutung nahe, daß

bei beiden Testmethoden, entweder verschiedene Antikörperarten im Spiele sind oder das dieselbe Antikörperart mit verschiedenen Antigenen reagiert.

Im Gegensatz zu toleranten Mäusen des NMRI- Stammes konnten in Serumgemischen und Einzelseren von kongenital infizierten, immuntoleranten CBA/J- Mäusen ähnlicher Altersstufen mit Hilfe des IKB- Testes keine Antikörper nachgewiesen werden. Demnach scheinen hinsichtlich der Antikörperbildungsfähigkeit bei toleranten Mäusen verschiedener Rassen Unterschiede zu bestehen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Vor der praktischen Anwendung der indirekten Komplementbindung als Methode zum Antikörpernachweis in Seren von LCM- immunen Mäusen mit oder ohne Immuntoleranz wurden in Vorversuchen möglichst günstige Bedingungen für die Antigenneutralisation hinsichtlich der Inkubationszeit und -temperatur sowie der Antigenkonzentration ermittelt.

In Seren von nicht toleranten erwachsenen Mäusen des NMRI- bzw. CBA/J-Stammes, die entweder experimentell oder durch Kontakt infiziert worden waren, konnten nahezu regelmäßig Antikörper durch indirekte Komplementbindung festgestellt werden. Dies war in Parallelversuchen auch durch direkte Kältebindung möglich, wobei letztere Methode sich im Durchschnitt als die empfindlichere erwies. Mit ihr können jedoch antigenneutralisierende Antikörper nicht nachgewiesen werden, die vielleicht auch bei der Neutralisation des infektiösen Virus eine gewisse Rolle spielen.

In Versuchen mit Serumgemischen und Einzelseren von kongenital infizierten, immuntoleranten NMRI- Mäusen verschiedener Altersstufen gelang der Antikörpernachweis durch indirekte Komplementbindung nicht regelmäßig und die Reaktionen waren im allgemeinen sehr viel schwächer als bei nicht toleranten immunen Tieren derselben Rasse. Auch die direkte Kältebindung lieferte in solchen Fällen sehr unregelmäßige Ergebnisse, die mit denen der indirekten Komplementbindung oft nicht übereinstimmten. Es bestehen daher Anhaltspunkte dafür, daß hier bei beiden Testarten entweder verschiedene Antikörper im Spiele sind oder daß dieselbe Antikörperart mit

verschiedenen Antigenen reagiert. Die positiven Reagenten bei den toleranten NMRI- Mäusen waren in der Hauptsache auf eine bestimmte Altersspanne (5 bis 8 Monate) beschränkt.

Im Gegensatz hierzu konnten bei kongenital infizierten, immuntoleranten CBA/J- Mäusen verschiedener Altersstufen (bis zu 14 Monaten) mit Hilfe der indirekten Komplementbindung ausnahmslos keine Antikörper im Serum nachgewiesen werden.

## SUMMARY

This paper deals with the application of the indirect complement-fixation test as a method for the demonstration of antibodies in serums of LCM-immune mice with or without immunological tolerance. In preliminary experiments the most favorable conditions for the neutralisation of complement-fixing antigen with special reference to the mode of incubation and the antigen dose were investigated.

Antibodies could be detected almost regularly in serums from non-tolerant adult mice of the NMRI and CRA/J strains, which had been infected either experimentally or by contact. This was also possible in parallel direct complement-fixation tests using cold fixation, a method slightly more sensitive than the indirect test but unable to detect antigen-neutralizing antibodies, which may play a certain role in the neutralization of infectious virus as well.

In tests of serum pools and individual serums from congenitally infected, tolerant NMRI mice of different age, direct complement fixation failed to detect antibodies regularly and the positive reactions obtained were generally much weaker than with comparable serums from non-tolerant animals of the same breed. Direct cold fixation tests likewise gave very irregular results in such cases. They did often not agree with those of the corresponding indirect tests. It may therefore be suspected that different kinds of antibodies or different antigens are involved in the two tests. The great majority of the donors of the positive serums belonged to a certain age group (5 to 8 months)

In contrast to NMRI mice, serums from congenitally infected virus carriers of the CBA/J strain of different age levels up to 14 months failed to give positive reactions in indirect complement-fixation tests.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Bechmann, G.            Versuche zur Wirksamkeitsprüfung von Maul-  
und Klauenseuche- vaccine an Mäusen  
Vet. med. Inaugural- Dissertation, München (1969)
- (2) Burnet, F. M.           The Production of Antibodies  
Fenner, F.            Second ed. Melbourne: Macmillan CO. (1949)
- (3) Calmette, A.           Sur une nouvelle réaction masquant dans les  
Massol, L.            serums la présence des anticorps tuberculeux.  
Compt. rend. Soc. d. biol. 68, 224-226 (1910)
- (4) Downie, A. W.           A study of the pox viruses by complement-fixation  
Macdonald, A.           and inhibition of complement-fixation methods  
J. Path. and Bact. 62, 389-401 (1950)
- (5) Goodner, K.           The complement-fixation reaction with pneumo-  
Horsfall, F. L.       coccus capsular polysaccharide  
Exper. Med. 64, 201-216 (1936)
- (6) Haas, V. H.           Folic acid deficiency and the sparing of mice  
Stewart, S. E.       infected with the virus of lymphocytic  
Briggs, G. M.       choriomeningitis  
Virology 3, 15-21 (1957)
- (7) Hotchin, J. E.       Persistent and Slow Virus Infections  
Monographs in Virology, Herausgeb. : J. L. Mel-  
nick, S. Karger-Verl. , Basel, München, Paris,  
London, New York, Sydney (1971)
- (8) Hotchin, J. E.       Late-onset kidney disease of mice with persistent  
Benson, L. M.       tolerant infection with lymphocytic chorio-  
Collins, D. N.       meningitis virus  
Fed. Proc. 22, No. 2 Part 1, 441 (only) (1963)

- (9) Hotchin, J. E.      The detection of neutralizing antibodies to  
Benson, L. M.      lymphocytic choriomeningitis virus in mice  
Sikora, E.      J. Immunol. 102, 1128-1135 (1969)
- (10) Karrer, H.      The complement-fixation inhibition test and its  
Meyer, K. F.      application to the diagnosis of ornithosis in  
Eddie, B.      chickens and ducks  
J. Infect. Dis. 87, 13-36 (1950)
- (11) Lehmann-Grube, F.      Lymphocytic Choriomeningitis Virus and Other  
Arenoviruses  
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York  
(1973)
- (12) Lehmann-Grube, F.      A new method for the titration of lymphocytic  
Hesse, R.      choriomeningitis viruses (Brief report)  
Arch. ges. Virusforsch. 20, 256-259 (1967)
- (13) Lehmann-Grube, F.      Lymphocytic Choriomeningitis Virus  
Virology Monographs  
Springer-Verlag Wien, New York (1971)
- (14) Mims, C. A.      Immunofluorescence study of the carrier state  
and mechanism of vertical transmission in  
lymphocytic choriomeningitis virus infection  
in mice  
J. Path. Bact. 91, 395-402 (1966)
- (15) Oldstone, M. B. A.      Lymphocytic choriomeningitis: production of  
Dixon, F. J.      antibodies by "tolerant" infected mice  
Science 158, 1193-1195 (1967)
- (16) Pollard, M.      LCM virus-induced immunopathology in congenitally  
Kajima, M.      infected gnotobiotic mice.  
Sharon, N.      In: Virus-Induced Immunopathology, Perspectives  
in Virology  
VI. Ed.: M. Pollard Academic Press, New York (1947)

- (17) Rice, C. E.                      Inhibitory effects of certain avian and mammalian antisera in specific complement-fixation systems  
J. Immunol. 59, 365-378 (1947)
- (18) Rice, C. E.                      Some factors influencing the selection of a complement-fixation method  
II. Parallel use of the direct and indirect technics  
J. Immunol. 60, 11-16 (1948)
- (19) Rice, C. E.                      Studies of the complement-fixation reaction in virus systems, V: In foot-and-mouth disease using direct and indirect methods  
Brooksby, J. B.                      J. Immunol. 71, 300-310 (1953)
- (20) Roger, F.                        Local reactivity to lymphocytic choriomeningitis virus in the mouse; its development as a new diagnostic test. A. R. for 1961  
Hotchin, J. E.                      Div. Lab. Res., N.Y.St.Dep.Hlth. (Albany)  
pp. 43-44 (1962)
- (21) Rowe, W. P.                      Studies on pathogenesis and immunity in lymphocytic choriomeningitis infection of the mouse  
Nav. Med. Res. Inst., Research Report: NM 005048.14.01, (1954)
- (22) Rowe, W. P.                      Protective effect of neonatal thymectomy on mouse LCM infection  
Black, P. H.                        Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 114, 248-251(1963)  
Levey, R. H.
- (23) Smadel, J. E.                      A soluble antigen of lymphocytic choriomeningitis  
Wall, M. J.                        III. Independence of anti-soluble substance antibodies and neutralizing antibodies, and the rôle of soluble antigen and inactive virus in immunity to infection  
J. exp. Med. 72, 389-405 (1940)

- (24) Schüle, E.           Über die Pathogenese der lymphocytären Choriomeningitis der Mäuse unter besonderer Berücksichtigung des weißen Blutbildes  
Vet. med. Inaugural-Dissertation, München (1973)
- (25) Traub, E.           The epidemiology of lymphocytic choriomeningitis virus in white mice  
J. exp. Med. 64, 183-200 (1936c)
- (26) Traub, E.           Persistence of lymphocytic choriomeningitis virus in immune animals and its relation to immunity  
J. exp. Med. 63, 847-861 (1936b)
- (27) Traub, E.           Factors influencing the persistence of choriomeningitis virus in the blood of mice after clinical recovery  
J. exp. Med. 68, 229-250 (1938b)
- (28) Traub, E.           Serologische Untersuchungen über die Immunität  
Schäfer, W.           der Mäuse gegen die lymphozytische Choriomeningitis  
Zbl. Bakt., 1. Abt. Orig. 144, 331-345 (1939)
- (29) Traub, E.           Über die natürliche Übertragungsweise des Virus der lymphocytären Choriomeningitis (LCM) bei Mäusen und ihre Parallelen zum Übertragungsmodus gewisser muriner Krebsviren  
Zbl. Bakt., 1. Abt. Orig. 177, 453-471 (1960a)
- (30) Traub, E.           Über die immunologische Toleranz bei der lymphocytären Choriomeningitis der Mäuse  
Zbl. Bakt., 1. Abt. Orig. 177, 472-487 (1960b)

- (31) Traub, E. Demonstration, properties and significance of neutralizing antibodies in mature mice immune to lymphocytic choriomeningitis (LCM)  
Arch. ges. Virusforsch. 10, 289-302 (1961a)
- (32) Traub, E. Observations on immunological tolerance and "immunity" in mice infected congenitally with the virus of lymphocytic choriomeningitis (LCM)  
Arch. ges. Virusforsch. 10, 303-314 (1961b)
- (33) Traub, E. Indirect complement-fixation tests in foot-and-mouth disease.  
Hessami, M.  
Shafiy, A. Zbl. Vet. Med., B 15, 421-432 (1968)
- (34) Traub, E. Indirect complement-fixation in foot-and-mouth disease. II. Screening of cattle serums.  
Hessami, M.  
Shafiy, A. Zbl. Vet. Med., B 15, 433-442 (1968)
- (35) Traub, E. Indirekte Komplementbindung mit Mäuseseren nach  
Bechmann, G. Schutzimpfung mit monovalenter Maul- und Klauen-seuche- Vaccine  
Zbl. Vet. Med., B 16, 240-252 (1969)
- (36) Wolfe, D. M. Simplified indirect complement-fixation test  
Kornfeld, L. applied to newcastle disease immune avian serum  
Markham, F. S. Proc. Soc. exp. Biol. and Med., 70, 490-494 (1949)
- (37) Zinsser, H. Observations on a substance in immune horse  
Parker, J. T. serum which interferes with alexin fixation  
J. Immunol. 8, 151-161 (1923)

### Lebenslauf

Am 27. August 1946 wurde ich, Hans Albrecht, als Sohn des Dr. Manfred Albrecht und seiner Ehefrau Hildegund, geb. Offner, in München geboren.

Nach vier Volksschulklassen in Gauting trat ich 1957 in das Ludwigsgymnasium Tegernsee ein. Nach drei Klassen wechselte ich in das Realgymnasium Starnberg, wo ich 1967 die Reifeprüfung ablegte.

Das Studium der Tiermedizin begann ich im Sommersemester 1967 an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München. Die Tierärztliche Prüfung legte ich 1973 dort ab.



Herrn Professor Dr. Dr. h.c. A. Mayr möchte ich für  
die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes  
danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. h.c.  
E. Traub und Fräulein F. Kesting für die Betreuung und  
jederzeit gewährte Unterstützung bei Anfertigung dieser  
Arbeit.









